

# **Desarrollo de un sistema no genotóxico para activar la respuesta al daño en el ADN**

**LUIS IGNACIO TOLEDO LÁZARO  
TESIS DOCTORAL**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**MADRID, 2009**



# Índice

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Fuentes y tipos de daño en el ADN .....</b>	<b>8</b>
<b>2. La respuesta al daño en el ADN .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Iniciación de la señal: PIKKs .....</b>	<b>12</b>
3.1. DNA-PKcs .....	14
3.2. ATM.....	15
3.3. ATR.....	16
3.4. Cooperación entre ATM, ATR y DNA-PKcs .....	19
<b>4. Amplificación de la señal .....</b>	<b>20</b>
<b>5. Efectos de la respuesta al daño en el ADN.....</b>	<b>23</b>
5.1. Reparación .....	24
5.2. Apoptosis .....	26
5.3. Control del ciclo celular .....	27
5.3.1. El ciclo celular .....	27
5.3.2. Control transitorio del ciclo: checkpoints.....	31
5.3.3. Parada permanente del ciclo: senescencia .....	34
<b>6. La DDR como mecanismo de supresión tumoral .....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
1. Clonaje.....	47
2. Cultivo celular .....	47
3. Infecciones y obtención de clones .....	48
4. Inmunofluorescencia HTM.....	48
5. Western Blotting .....	50
6. RNAi .....	51
7. Checkpoints, proliferación y senescencia.....	51

8. Ensayo de cometa.....	52
9. Southern Blotting.....	52
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Generación de un sistema inducible para la activación de de la DDR .....</b>	<b>57</b>
1.1. Fundamento de la activación ectópica de ATR .....	57
1.2. Diseño de un sistema inducible .....	58
<b>2. Caracterización y funcionamiento del sistema en células primarias de mamífero.....</b>	<b>59</b>
2.1. Activación de ATR por la acción de la quimera TAD <sup>ER</sup> .....	61
2.2. La quimera TAD <sup>ER</sup> activa específicamente a ATR en respuesta a 4OHT.....	63
2.3. La activación de ATR se produce en ausencia de daño en el ADN .....	64
2.4. La activación de ATR es capaz de inducir checkpoint en MEF.....	67
2.5. El checkpoint G1/S inducido por ATR depende de p53 pero no de ATM.....	68
2.6. El checkpoint permanente detiene la proliferación celular en MEF.....	70
2.7. La actividad persistente de ATR provoca la entrada en senescencia. ....	71
2.8. ATR induce senescencia no asociada a daño en el ADN .....	72
2.9. La senescencia inducida por ATR es dependiente de p53, pero no de p19 <sup>ARF</sup> .....	73
<b>3. Expresión del sistema en líneas inmortales.....</b>	<b>74</b>
3.1. ATR fosforila múltiples substratos en líneas inmortales.....	75
3.2. La fosforilación de substratos provocada por TAD <sup>ER</sup> necesita RPA, Rad9 y ATRIP ..	76
3.3. La activación ectópica de ATR no es suficiente para ubiquitinar FANCD2 .....	77
3.4. Inducción de efectores del arresto en G1 por la actividad de ATR.....	78
3.5. Inducción del checkpoint G1/S por actividad de ATR en G1 .....	79
3.6. El sistema TAD <sup>ER</sup> activa un checkpoint en G2 a través de Chk1.....	82
3.7. La señalización persistente de ATR detiene la proliferación e induce senescencia en NIH3T3 y MCF-7.....	83
3.8. La senescencia en la línea humana MCF7 viene acompañada de la activación de Rb y la aparición de SAHF .....	84
<b>4. Expresión del sistema en un modelo animal .....</b>	<b>86</b>
<b>5. Aplicaciones del sistema de activación artificial de ATR.....</b>	<b>91</b>
5.1. ¿Puede utilizarse el sistema basado en TAD para estimular la reparación de DSB? ...	92
5.1.1. La fosforilación deslocalizada de H2AX no influye en la formación de focos.....	93
5.1.2. EL sistema TAD <sup>ER</sup> estimula la reparación de DSB.....	95
5.1.3. La activación de ATR por TAD <sup>ER</sup> estimula la reparación en células carentes de ATM.....	97
5.2. ¿Es la senescencia reversible? .....	98
5.2.1. El sistema TADER no es funcionalmente reversible .....	99



5.2.2. Desarrollo de un sistema inducible y reversible.....	100
5.2.3. Evidencias sobre la no reversibilidad de la senescencia .....	103
5.3. ¿Puede utilizarse ATR como diana terapéutica contra el cáncer?.....	106
5.3.1. Diseño de un <i>screening</i> de inhibidores de ATR.....	107
5.3.2. Identificación de inhibidores potenciales de ATR.....	110
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>115</b>
1. Es posible activar la DDR sin el uso de agentes genotóxicos en células de mamífero	115
2. El complejo ATR/ATRIP activado por TAD fosforila a sus substratos fundamentales en ausencia de daño.....	117
3. ATR estimulada por TAD es capaz de activar los checkpoints en G1 y G2.....	122
4. ATR es activada por TAD en G1, complementando la ausencia de ATM.....	124
5. La señalización persistente de ATR inducida por TAD puede desencadenar senescencia en células en cultivo.....	127
6. Activación e inhibición de ATR como terapia contra el cáncer.....	132
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>155</b>



## ABREVIATURAS

4OHT	4-hidroxi-tamoxifeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
DD	Dominio desestabilizador
DDR	Respuesta al daño en el ADN
DSB	Rupturas de doble cadena
Gy	Gray
$\gamma$ H2AX	Forma fosforilada de la histona H2AX (S139)
HR	Recombinación homóloga
HTM	Microscopía de alto rendimiento
HU	Hidroxiurea
IR	Radiación ionizante
IRIF	Focos inducidos por radiación ionizante
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
NCS	Neocarcinostatina
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
OIS	Senescencia inducida por oncogenes
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAHF	Focos de heterocromatina asociados a senescencia
siRNA	RNA corto de interferencia
TAD	Dominio de activación de TopBP1
TADER	TAD fusionado al receptor de estógenos
TADERDD	TAD fusionado al receptor de estógenos y al DD
UV	Radiación ultravioleta
WB	Western Blotting

ATM	Ataxia-Talangiectasia Mutated
ATR	ATM and Rad3 Related
ATRIP	ATR Interacting Protein
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
H2AX	Histona 2A variante X
RPA	Replication Protein A
TopBP1	Topoisomerase II Binding Protein 1



## ABSTRACT

ATR is, together with ATM, one of the main kinases responsible in signaling DNA damage to the cell. Based on the recent discovery of an allosteric activator of ATR, we have developed a genetic tool capable of activating ATR without using any DNA damaging drugs. Since no other DNA damage foci related signals are unleashed in this system, it let us test the real importance of ATR phosphorylation cascade in the DNA damage response.

A domain in TopBP1 has been shown to be able alone to activate ATR in vitro in an allosteric manner (TAD or TopBP1 Activating Domain). We designed a retroviral vector in which we integrated this domain fused to the estrogen receptor, so we had a system that allowed us to control TAD and ATR interaction by the use of 4-OHT. We demonstrated that a set of ATR dependent phosphorylation events take place by inducing the system in mammalian cells. This phosphorylations include H2AX and Chk1, and are independent of ATM. In contrast to a normal DNA damage situation, ATR is activated by TAD in an stochastic fashion throughout the cell cycle, which leads to the induction of DNA Damage checkpoints both in G1 and G2 transitions, once again independently of ATM. Checkpoint in G1 showed a strong dependency on p53, whereas the arrest in G2 was rapidly unleashed by Chk1. ATR could be persistently activated by continuous exposure to 4OHT, which provoked a proliferation blockage, not seen, though, in p53 deficient cells. Cells in which ATR was constantly activated entered senescence in a p53 dependent manner, process for which the Ink4a/ARF locus was dispensable. This could be observed both in primary and immortal lines. In human cells, ATR induced senescence was characterized by the dephosphorylation of Rb and the appearance of SAHF. Together, our results show that ATR is able to elicit a full DNA damage response when activated stochastically by TAD, which leads to a full proliferation arrest and the senescence of the cells.

Besides, the system we developed allowed us to address different fundamental questions, taking advantage of the special features of firing a DNA damage response in the absence of DNA damage. First, we showed that additional signaling by ATR was able to improve DSB repair in response to IR. Second, we modified the system to create a homologous but also reversible platform, which we're using to analyze the possibility of senescence reversal. Third, our system has shown to be a powerful tool to detect specific events that could inhibit ATR activity. In that sense, we have design a High Throughput Screening to identify potential ATR inhibitors that could be further developed and used in the clinic for anticancer therapies.



# INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la vida la acumulación de variaciones en el código genético ha posibilitado la evolución como mecanismo de adaptación al medio, dando origen a la selección natural y la aparición de nuevas especies. Sin la tolerancia natural del ADN a adoptar modificaciones en su secuencia, pero sin perder su estructura macromolecular y funcionalidad, la vida no habría podido surgir ni evolucionar. Por otro lado, fragmentos de información recogidos en genes que regulan funciones biológicas básicas se han transmitido prácticamente inalterados hasta llegar a nuestros días, de especie a especie y de generación en generación. A pesar de esta aparente contradicción, la naturaleza ha tenido que ganar la batalla a las leyes básicas de la termodinámica para permitir la moderada capacidad mutagénica de nuestro material genético. Como cualquier molécula compleja, el ADN es químicamente inestable en condiciones normales, a pesar de poseer un armazón muy resistente si lo comparamos con otras estructuras biológicas. Sin barreras ni mecanismos de protección ante la degradación química y la acción de agentes físicos y químicos especialmente reactivos, el número de alteraciones que acumularía el ADN en la estructura primaria sería tan alto que no se alcanzarían los requisitos de estabilidad sobre los que se basa la vida. Además, estos mecanismos de protección tienen la misión de asegurar la funcionalidad de la información genética durante toda la vida celular. Gracias a ellos ha sido posible alcanzar el equilibrio entre mutabilidad e inalterabilidad compatible con la vida. En organismos superiores la eficacia de estos sistemas de protección es de especial trascendencia. El número de veces que el ADN ha de ser replicado, así como el tiempo que ha de transcurrir para ser transmitido a la descendencia a través de la línea germinal es mucho mayor, aumentando la probabilidad de acumular lesiones y mutaciones que hagan peligrar la viabilidad de las generaciones futuras y la perpetuación de la especie. En estos organismos, además, la acumulación temprana de alteraciones genéticas en células somáticas podría dar lugar al desarrollo de cáncer y acabar con la vida de los individuos antes de dar lugar a la descendencia.

La forma fundamental de protección de la integridad genómica es la detección y reparación de las lesiones que el ADN pueda sufrir, con el objetivo de mantener la complementariedad de la doble cadena y su estructura tridimensional intactas. Mientras que otros componentes de la célula, incluso macromoleculares, pueden ser sintetizados de novo una vez se han deteriorado hasta perder su función, el ADN es una molécula individual que debe basarse en los patrones de su propia estructura para mantenerse inalterada. La doble copia de ADN que cada célula porta debe estar bajo observación constante para detectar cualquier tipo de alteración que se haya producido y repararla en el menor tiempo posible. Existen mecanismos moleculares

específicos de vigilancia que perciben cualquier cambio en la configuración espacial de la doble hélice, desde la falta de complementariedad en un par de nucleótidos hasta rupturas de una o las dos hebras. Por una parte, pequeñas alteraciones de la estructura química de las bases pueden provocar mutaciones cuando el par dañado no se repara correctamente y es sustituido por otro diferente. Muchas mutaciones son neutras para la funcionalidad celular, pero conforme aumenta el número de éstas, la probabilidad de tener consecuencias deletéreas para la célula es mayor. Por otro lado, la acumulación progresiva de mutaciones no letales puede acabar provocando una proliferación celular descontrolada, y en último término, cáncer. Sin embargo, las lesiones en la estructura secundaria son claramente las más graves que puede sufrir el ADN de una célula, consideradas como el verdadero daño genómico. Las rupturas, ya sea de una o de las dos hebras, son incompatibles con la transcripción génica, la replicación y la división celular, pueden provocar translocaciones y fusiones cromosómicas, y tienen, además, un alta capacidad mutagénica. La aparición de largos segmentos de ADN desapareado o de cadena sencilla representa también una seria amenaza, ya que tienen un alto poder recombinagénico y pueden acabar generando rupturas. Sufrir cualquiera de estas lesiones supone un serio peligro para la integridad del genoma. Para poder repararlas de la forma más rápida y eficaz posible, la respuesta que la célula necesita desencadenar engloba distintos procesos fundamentales, interconectados en una compleja red definida como la respuesta al daño en el ADN.

## 1. Fuentes y tipos de daño en el ADN

El genoma de cualquier ser vivo está constantemente expuesto a multitud de fuentes de daño, tanto exógenas como endógenas. La principal fuente exógena es la radiación, capaz de penetrar hasta el núcleo de la célula y provocar diversas lesiones en la estructura química del ADN, ya sea por desestabilización consecuencia de una absorción directa, o mediante la generación en el entorno de especies iónicas y radicales libres altamente reactivos. Así, por su diferente mecanismo de acción, se pueden clasificar los diferentes tipos de radiación como ionizante (o IR, del inglés *Ionising Radiation*) y no ionizante. La radiación no ionizante es principalmente radiación electromagnética de longitud de onda ultravioleta, ya que existe un pico de absorción máxima del ADN a 260 nm. Todos los rangos de frecuencia del ultravioleta (UVA, UVB y UVC) tienen una mayor o menor capacidad de inducir enlaces covalentes entre nucleótidos, generando dímeros de distinta naturaleza entre bases (Jiang et al., 2009). Aunque la radiación ultravioleta tiene también cierto poder ionizante, sus efectos nocivos sobre las

células derivan mayoritariamente de la aparición de dímeros en el ADN, al ser fuente de mutaciones potenciales y poder bloquear tanto la maquinaria transcripcional como la replicativa (Batista et al., 2009). Por otro lado, estrictamente ionizantes se consideran las radiaciones electromagnéticas gamma y de rayos-X, si bien entran también en esta categoría las emisiones de partículas subatómicas  $\alpha$  y  $\beta$  (aunque éstas tienen mucha menos penetrancia). Aun siendo de distinta naturaleza, estas emisiones de alta energía tienen en común la capacidad de alterar irreversiblemente la configuración electrónica de muchos compuestos químicos, generando en última instancia en el medio circundante formas iónicas o radicales libres derivados del oxígeno altamente inestables y reactivos (ROS o *Reactive Oxygen Species* en inglés). Estas especies, como son el ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), pueden llegar a romper los enlaces fosfodiéster entre desoxirribosas, provocando así rupturas de cadena doble (o DSB, del inglés *Double Strand Break*) o simple. Además, pueden reaccionar con los nucleótidos en diferentes puntos de su estructura, dando como resultado formas modificadas de las bases que generalmente perturban la configuración de los enlaces de hidrógeno, provocando desapareamientos. El origen de estas moléculas altamente reactivas puede ser exógeno, como producto, además de la radiación ionizante, de la exposición a carcinógenos ambientales, drogas utilizadas en quimioterapia, algunos metales de transición y oxidantes químicos.

Sin embargo, tras décadas de estudio se ha llegado a la conclusión de que la mayor parte del daño oxidativo que sufre el ADN es debido a especies resultantes de la actividad metabólica celular. Aunque la sobreexposición a muchos agentes genotóxicos externos puede aumentar la tasa de mutaciones y otras aberraciones estructurales, el ADN se encuentra bajo el constante acoso de especies reactivas de oxígeno, producto principalmente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Toda esta serie de alteraciones se conoce como daño oxidativo.

Además de las rupturas, ya sean de cadena simple o doble, existen otras alteraciones conformacionales que son sentidas como daño por la célula. Para duplicar el ADN, las horquillas de replicación han de abrir temporalmente la doble hebra, exponiendo pequeñas secciones de cadena simple. Cualquier obstáculo que cause un bloqueo de la maquinaria replicativa mientras el ADN es desenrollado puede provocar que las horquillas se abran excesivamente y que largos fragmentos de cadena simple se expongan. La célula entiende este fenómeno como una alteración del normal transcurso de la replicación y lo detecta como una amenaza a la integridad del genoma sin necesidad de que aparezcan rupturas, a pesar de que muchas de estas perturbaciones en las horquillas pueden finalmente provocarlas. En general, cualquier tensión que aparezca en la horquilla como consecuencia de que alguno de los componentes de la maquinaria replicativa pierda procesividad es una potencial fuente de daño. Otros obstáculos, como las uniones covalentes entre las cadenas complementarias de ADN suponen un bloqueo para la replicación y pueden desembocar en rupturas (Dronkert and

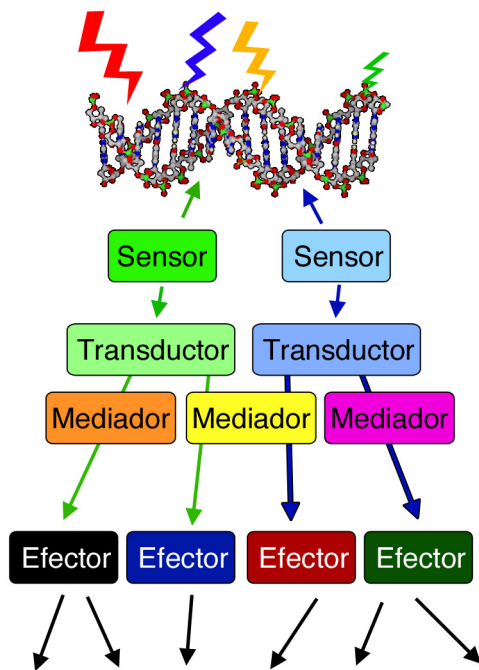
Kanaar, 2001). Por otra parte, las topoisomerasas (tipo I y II) son enzimas capaces de liberar la tensión provocada por el superenrollamiento que aparece delante de la horquilla durante la replicación. Para ello abren y religan una o las dos hebras, convirtiéndose en una potencial fuente de rupturas si su acción ligadora se bloquea (D'Arpa et al., 1990).

Una de las características que diferencia a las células tumorales de las sanas es su alto nivel proliferativo. Desde el comienzo de las terapias contra el cáncer, esta observación ha sido utilizada por el hombre para eliminar selectivamente las células malignas, mediante el uso de productos genotóxicos que específicamente generan daño durante la replicación. Comprender molecularmente en detalle cómo los diferentes agentes químicos dañan el ADN, y cómo este daño es procesado y señalizado en los diferentes contextos genéticos, se ha convertido en una prioridad de cara al diseño de terapias combinadas efectivas para cada tipo de cáncer. En el laboratorio se hace uso de muchas fuentes diferentes de daño para el estudio de las rutas metabólicas implicadas en la respuesta al daño en el ADN. Por un lado las radiaciones ionizantes de fuentes radiactivas o compuestos radiomiméticos como la neocarzinostatina (NCS), permiten generar DSB tanto en células en cultivo como en animales. Estos agentes son especialmente útiles para estudios de radiosensibilidad, reparación y señalización. La hidroxiaurea (HU), la afidicolina y otros compuestos utilizados en quimioterapia sirven para generar estrés replicativo y rupturas en células proliferando. Cada agente perturba la replicación por un flanco distinto, provocando lesiones de distinta naturaleza y toxicidad. Son de uso común además la doxorubicina (intercalante en el ADN), el etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II), la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I), o el metil-metano-sulfonato (MMS, alquilante del ADN)

## 2. La respuesta al daño en el ADN

Lo que conocemos como respuesta al daño en el ADN o DDR (del inglés *DNA Damage Response*) engloba todos aquellos procesos que la célula pone coordinadamente en funcionamiento para mantener la integridad del genoma (Harper and Elledge, 2007). Aunque el tipo de respuesta depende en mayor parte de la naturaleza y de la cantidad de lesiones que se han de solucionar, la DDR puede, además de activar la reparación del ADN, detener el ciclo celular, activar programas de transcripción, e incluso provocar la muerte o la senescencia celular. La inmensa mayoría de pequeñas lesiones, como las modificaciones puntuales de las bases, que se producen constantemente, son reparadas sin ningún trastorno para la célula. Sólo cuando la cantidad de este tipo de alteraciones es lo suficientemente grande como para

interferir con la maquinaria de replicación se dispara una señal que implica parada del ciclo celular o activación de los puntos de control (o *checkpoints* en inglés). Sin embargo las lesiones estructurales desafían más gravemente la integridad del ADN y amenazan la supervivencia celular, por lo que son las alteraciones que más capacidad tienen para activar los checkpoints, la entrada en apoptosis o la senescencia. Las rupturas de doble cadena son las más severas para la célula, y en muchos casos son la consecuencia final de la tensión en las horquillas o de rupturas monocatenarias. Sin la apropiada respuesta a estas alteraciones, se puede llegar a provocar translocaciones y fusiones cromosómicas que impiden la correcta segregación durante la mitosis, o al contrario, que fragmentos cromosómicos separados por una ruptura pueden perderse en subsecuentes divisiones. Una pérdida de información genética de ese calibre sería letal para la célula en la mayoría de los casos, aunque también podría servir de evento iniciador de una transformación celular si el fragmento perdido contiene genes de supresores tumorales.



**Introducción. Figura 1 | Estructura de la respuesta al daño en el ADN.** Diferentes tipos de daño son reconocidos por sensores específicos, que reclutan a los transductores para emitir la señal. Con la ayuda de mediadores, esta señal es amplificada y transformada hasta alcanzar a los efectores, que ejecutan las diferentes acciones necesarias.

Molecularmente, la respuesta al daño en el ADN es mediada por un sistema de señalización jerárquico y altamente diversificado, capaz de activar de forma específica y ordenada diferentes grupos de proteínas para llevar a cabo cada una de las tareas requeridas por la célula (Figura 1). Se necesita que los distintos componentes de la respuesta estén perfectamente coordinados, tanto espacial como temporalmente. En primer lugar se ha de detectar físicamente la lesión. Seguidamente, para que la célula pueda comunicar la presencia del daño, se debe emitir y amplificar una señal en forma de modificaciones postraduccionales que permita la rápida activación de los diferentes componentes de la respuesta. Una vez reparado el daño la célula ha de ser capaz activamente de

apagar la señal, revirtiendo los componentes de la respuesta a su estado inactivo.

Los componentes de la DDR se han clasificado jerárquicamente por sus diferentes funciones. De forma ordenada los primeros en actuar son los sensores, que están en contacto directo con

la cromatina y detectan la lesión de forma instantánea. Para comunicar su aparición a la célula, los sensores reclutan a los transductores a la lesión, que se activan e inician la señal que desencadenará la respuesta celular. Finalmente, la señal es recibida por los efectores, las proteínas encargadas de ejecutar las tareas que requiere la DDR. No obstante, para que la señal emitida desde la lesión sea recibida en todo el núcleo y sea capaz desencadenar procesos de naturaleza tan diversa, es necesario que sea apropiadamente modulada y amplificada. Así, los denominados mediadores y adaptadores son los encargados de que la señal inicial sea transformada y amplificada, de forma que tanto procesos locales como a nivel celular se ponen en funcionamiento.

### 3. Iniciación de la señal: PIKKs

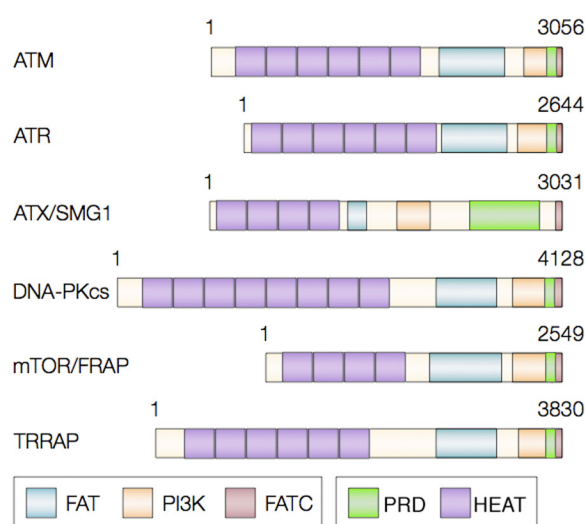
Existen diferentes complejos enzimáticos de transducción de la señal que se movilizan inmediatamente en respuesta al daño en el ADN. Los más significativos y estudiados son las quinasas ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad3 Related*) y DNA-PKcs (*DNA Protein Kinase catalytic subunit*) (Su, 2006). Aunque una vía esencial de señalización es iniciada por estas quinasas, las lesiones también provocan otras cascadas de modificaciones postraduccionales que son fundamentales para expandir y modular la señal, como la ubiquitinación, acetilación y sumoilación (van Attikum and Gasser, 2009). Esta creciente complejidad permite la elaboración de una señal molecular más precisa y más regulable, proporcionando un mejor control sobre cada una de las funciones de la respuesta al daño y sobre la toma de decisiones por parte de la célula. La transmisión de la señal es posible gracias a que las modificaciones postraduccionales activan complejos enzimáticos inactivos y promueven interacciones proteína-proteína previamente inexistentes, generándose así una cascada creciente de activaciones. Además de promover la actividad enzimática, estas modificaciones postraduccionales tienen otras funciones reguladoras, como controlar la estabilidad de la proteína o modular interacciones proteína-ADN.

ATM y DNA-PKcs se activan en respuesta a rupturas de doble cadena en todas las fases del ciclo celular (Gottlieb and Jackson, 1993; Pandita et al., 2000). Por otro lado, ATR es la responsable de señalar la aparición de ADN de cadena sencilla o ssDNA (*single stranded DNA* en inglés), y su actividad está confinada a las fases S y G2 (Zou and Elledge, 2003). En condiciones normales, la actividad de DNA-PKcs está restringida a la zona de la lesión y promueve fundamentalmente la reparación de los DSB (Collis et al., 2005), mientras que ATM y ATR tienen un papel esencial en la señalización global del daño, y son capaces de fosforilar



más de 700 substratos conocidos de la respuesta al daño *in vivo* (Matsuoka et al., 2007). A pesar de esta aparente separación de roles, conviven en un entorno común en respuesta al daño, y una ruptura de doble cadena puede llegar a implicar la activación de las tres quinasas y ser reparada por diferentes mecanismos en función de la fase del ciclo celular. A lo largo de todo el ciclo la célula es capaz de solucionar las rupturas mediante la unión de extremos no homólogos o NHEJ (*Non Homologous End Joining* en inglés), y es el mecanismo básico de reparación en G1. En las fases S y G2 dispone además de la recombinación homóloga o HR (*Homologous Recombination* en inglés), que utiliza el ADN replicado o cromátida hermana como molde para resolver la ruptura. Así, un DSB puede activar la respuesta de ATR, cuando en las fases S o G2 la ruptura es procesada para liberar ssDNA que permita la reparación mediante HR (Branzei and Foiani, 2008).

ATM, ATR y DNA-PKcs pertenecen, junto a mTOR, SMG1 y TRRAP, a la familia de las PIKKs o *PI-3-kinase-related-kinases*, por su homología con la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K o *phosphatidylinositol-3-kinase* en inglés) (Shiloh, 2003a). A diferencia de ésta, responsable de la fosforilación de lípidos implicados en señalización de membrana, ATM, ATR y DNA-PKcs fosforilan proteínas específicamente en residuos serina y treonina, preferencialmente seguidos por un glutámico (sitios SQ/TQ). Son proteínas de pesos moleculares inusualmente altos (entre 300 y 500 kDa) en las que el dominio quinasa está altamente conservado. A pesar de su gran tamaño, este dominio supone únicamente el 5-10% del total de la proteína, lo que implica que una gran parte de la cadena polipeptídica tiene estrictamente funciones reguladoras. Estas proteínas comparten una distribución estructural similar, caracterizada por una larga región amino-terminal repleta de repeticiones HEAT (nombre derivado de *Huntingtin*, *Elongation factor 3*, *a subunit of protein phosphatase 2A*, and *TOR1*), y una región carboxi-terminal compuesta por los dominios FATC (*FAT C-terminal*), quinasa (dominio catalítico PI3K), PRD (*PIKK Regulatory Domain*) y FAT (*FRAP*, *ATM* and *TRRAP*) (Lovejoy and Cortez, 2009).



**Introducción. Figura 2 | Homología de las PIKKs.** Homología de dominios de las diferentes PIKKs. Entre el dominio PI3K (quinasa) y el FATC se sitúa el PRD. La función exacta de este dominio es desconocida salvo en el caso de ATR (Adaptado de Shiloh, 2003).

El dominio FATC parece ser esencial para la actividad quinasa de todas las PIKKs (Mordes and Cortez, 2008). Sin embargo, no se ha establecido un mecanismo claro de acción para los dominios FAT y FATC, aunque, dada su proximidad al dominio quinasa, es lógico pensar que regulen tridimensionalmente el acceso del mismo a factores moduladores y sustratos. El último en ser caracterizado fue el dominio PRD, revelándose como una zona esencial en la regulación de la actividad de ATM, ATR, DNA-PKcs y mTOR. Sólo en el caso de ATR se conoce en detalle la función del PRD, ya que es el sitio de unión del activador alostérico TopBP1 (Mordes et al., 2008a). Se especula que en el caso de ATM y DNA-PKc, el PRD esté implicado en el reclutamiento específico de estas proteínas a los sitios de daño. En resumen, estos dominios permiten a las PIKKs interactuar con otros factores que modulan su actividad y controlan su localización, permitiendo a la célula un absoluto control de la señal que ha de establecerse en respuesta a diferentes estímulos. A pesar de tener una secuencia relativamente conservada, son las divergencias en estos dominios funcionales las que permiten establecer mecanismos de regulación específicos para cada una de las enzimas.

### 3.1. DNA-PKcs

DNA-PKcs es movilizada a las rupturas por el par Ku70/Ku80, un sensor del daño capaz de unirse directamente a los extremos del DNA y estabilizar los DSB (Smith and Jackson, 1999). El complejo heterotrimérico ku70/80/DNA-PKcs forma la quinasa catalíticamente activa DNA-PK (Gottlieb and Jackson, 1993), encargada de promover la reparación a través de NHEJ (Mahaney et al., 2009). Así, además de reparar rupturas aleatorias, DNA-PK es esencial para la recombinación V(D)J que tiene lugar en el desarrollo de la línea linfocítica (Jackson and Jeggo, 1995; Taccioli et al., 1998). Una vez unida a Ku70/80, DNA-PKcs se autofosforila en varios residuos (Chan et al., 2002), provocando un cambio conformacional que facilita que los demás factores necesarios para la ligación tengan acceso a los extremos del ADN (Cui et al., 2005; Reddy et al., 2004; Uematsu et al., 2007).

Aunque DNA-PK funciona como quinasa sólo localmente, puede fosforilar sustratos comunes a ATM y ATR, como H2AX, contribuyendo a aumentar la capacidad de señalización y atrayendo otros mediadores a los sitios de daño (Stiff et al., 2004). La ausencia de DNA-PK en ratón resulta en un fenotipo característico de reparación deficiente, con inmunodeficiencia e hipersensibilidad a la radiación ionizante (Biedermann et al., 1991; Smith and Jackson, 1999). DNA-PK es indispensable para el desarrollo embrionario en ausencia de ATM (Gurley and Kemp, 2001) y un reciente trabajo muestra como, en linfocitos, DNA-PK es necesaria para



complementar funciones que en condiciones normales son llevadas a cabo inicialmente por ATM (Callen et al., 2009b). Estas evidencias de cierta redundancia funcional a nivel molecular son relevantes sólo en ausencia de ATM, aunque DNA-PK no puede suplir sus funciones completamente. Las diferencias entre las dos quinasas se evidencian en base a la importancia de ATM para el establecimiento de los checkpoints.

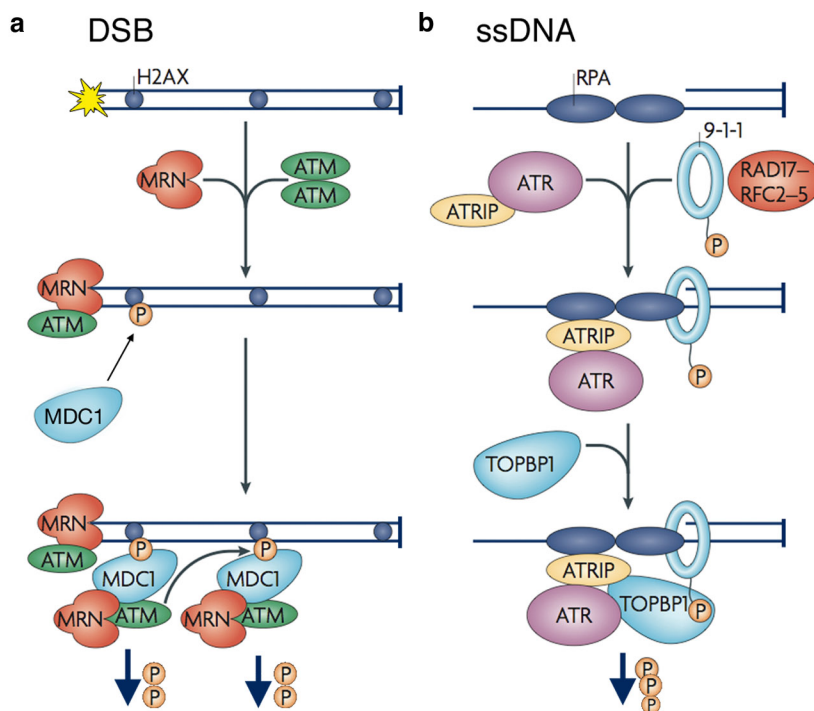
### 3.2. ATM

La falta de actividad de ATM fue identificada como la causante de una grave patología autosomal recesiva llamada Ataxia-Talangiectasia (A-T) (Savitsky et al., 1995). Estos pacientes presentan, entre otros (Becker-Catania and Gatti, 2001), todos los signos de una deficiencia en la capacidad de respuesta a rupturas de doble cadena, como son inmunodeficiencia, inestabilidad genómica, predisposición a cáncer linfóide, e hipersensibilidad a la radiación ionizante (Shiloh and Kastan, 2001). Aunque se conocen estímulos que activan ATM diferentes al daño en el ADN (Bakkenist and Kastan, 2003; Kanu and Behrens, 2007), la respuesta a DSB es dirigida por el complejo MRN, compuesto por Mre11, Rad50 y Nbs1 (Lee and Paull, 2004; Lee and Paull, 2005; Uziel et al., 2003) (figura 3, a). El complejo MRN se une de forma rápida e independientemente a los DSB, por lo que fue propuesto como un sensor genuino de rupturas en el ADN (Petrini and Stracker, 2003). Aunque el mecanismo exacto de cómo sus componentes median en la activación de ATM no se ha establecido, mutaciones en Nbs1 y en Mre11 son la causa de síndromes humanos con similitudes claras a AT (Kobayashi et al., 2004; Stewart et al., 1999). Nbs1 es capaz de interactuar con ATM a través de su extremo C-terminal (You et al., 2005) y atraerla a los DSB inmediatamente después del daño, a lo que contribuye que ATM está en contacto activo con la cromatina (Kim et al., 2009). Aunque Nbs1 es fosforilado por ATM, acude a los DSB de forma independiente (Celeste et al., 2003), por lo que se considera el evento iniciador de la señal. Mre11 y su interacción con Nbs1 a través del mismo extremo C terminal son también necesarios para activar ATM en las rupturas (Carson et al., 2003; Horejsi et al., 2004). La posterior fosforilación de Nbs1 aumenta la afinidad del complejo por la zona de la ruptura (Lukas et al., 2003), lo que contribuye a la expansión de la señal. Se considera que ATM se activa catalíticamente al pasar de un estado dimerico a monomérico, lo que expone su dominio quinasa. En células humanas se cree que este proceso es consecuencia de una serie de autofosforilaciones (Bakkenist and Kastan, 2003; Kozlov et al., 2006). Sin embargo, se ha comprobado que estos sitios conocidos de autofosforilación son irrelevantes para la actividad catalítica de ATM *in vivo* (Daniel et al., 2008; Pellegrini et al., 2006), aportando evidencias definitivas de que son una consecuencia y

no la causa de su activación. De esta forma, otras interacciones y/o modificaciones podrían ser determinantes (Sun et al., 2005; Sun et al., 2007) para disparar la actividad catalítica de ATM.

Hay evidencias de que ATM tiene un papel directo en estimular reparación, debido a la persistencia de rupturas no reparadas en células A-T incluso en ausencia de proliferación (Kuhne et al., 2004). Se piensa que ATM es necesaria para resolver sólo cierto tipo de lesiones, que no serían reparadas rápidamente por la vía clásica de NHEJ, y que implican la actividad de Artemis (Riballo et al., 2004). Estas lesiones podrían ser DSB difíciles o sucios, que requirieran a Artemis para un procesamiento enzimático previo (Goodarzi et al., 2006). Por otro lado se ha propuesto que este papel específico de ATM en la reparación de un porcentaje de DSB se debe

a que estos se localizan en heterocromatina, dificultando su reparación (Goodarzi et al., 2008). De hecho, existen evidencias de que la fosforilación de KAP1 por parte de la DDR es capaz de relajar globalmente la cromatina, quizás para facilitar la reparación (Ziv et al., 2006). En cualquier caso, experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la compactación de la cromatina principalmente limita la función de ATR, más que de ATM (Murga et al., 2007).



### Introducción. Figura 3 | Mecanismo de activación de ATM y ATR.

**a**, ATM acude a los DSB con el complejo MRN. La fosforilación de H2AX y reclutamiento de MDC1 amplifica la actividad de ATM. **b**, ATR es reclutada por RPA a los segmentos de ssDNA, activándose al interactuar con TopBP1 (Adaptado de Cimprich & Cortez, 2008).

### 3.3. ATR

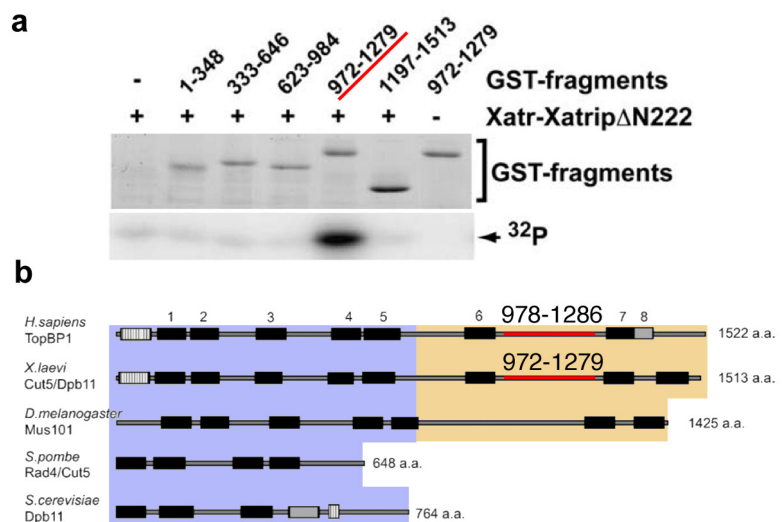
La investigación de las quinasas de la DDR ha estado históricamente más enfocada a ATM, en parte por su mayor implicación en síndromes humanos conocidos. Una mutación en ATR es una de las causas de la enfermedad de Seckel (Griffith et al., 2008; O'Driscoll et al., 2004;

O'Driscoll et al., 2003), de la que existen muy pocos casos registrados. Esta mutación neutra en el exón 9 de ATR altera el *splicing* generando mayoritariamente una proteína truncada y no funcional, de forma que estos pacientes sobreviven con un 5% de los niveles normales de ATR. Esta insuficiencia provoca graves alteraciones en el desarrollo, envejecimiento prematuro y un grave enanismo. ATR es esencial para el desarrollo embrionario (Brown and Baltimore, 2000), lo que ha conllevado una enorme limitación técnica en el estudio de su función a nivel molecular y su relevancia en la respuesta al daño. Sin embargo, la investigación llevada a cabo los últimos años ha aportado un amplio conocimiento al mecanismo de acción de ATR, dilucidando su papel global y esencial en la supervisión de la replicación. El modelo humanizado del síndrome de Seckel, desarrollado en nuestro laboratorio, ha permitido revelar como el estrés replicativo asociado a una insuficiente actividad de ATR es la causa de un fenotipo tan severo (Murga et al., 2009). Cuando las horquillas de replicación se bloquean en respuesta a alteraciones en el ADN, la actividad de ATR mantiene la estabilidad de los complejos replicativos, necesaria para reanudar correctamente la síntesis de ADN (Paulsen and Cimprich, 2007). Tanto la actividad en las horquillas como la inducción de los checkpoints responden a la sensibilidad de ATR hacia cadenas de ADN monocatenario anormalmente largas. Éstas pueden aparecer, por un lado, como consecuencia de la descoordinación entre la maquinaria de replicación y de desenrollamiento en el avance de las horquillas durante la fase S. También se genera ssDNA tras el procesamiento de ciertas lesiones en el ADN como la resección de rupturas de doble cadena en las fases S y G2 del ciclo. ATR sólo existe como parte de un complejo heterodimérico con ATRIP (ATR Interacting Protein), que es necesaria para su actividad señalizadora y responsable de la correcta relocalización a los sitios de ssDNA (Cortez et al., 2001; Zou and Elledge, 2003). Para ser activo, el complejo ATR-ATRIP necesita además interaccionar con la proteína TopBP1, que funciona como un inductor alostérico directo del dominio quinasa de ATR (Kumagai et al., 2006). Mientras que ATR y ATRIP coexisten indivisiblemente como complejo, solo interaccionan con TopBP1 cuando los tres componentes son reclutados a las zonas de ssDNA, disparando entonces la actividad quinasa de ATR (figura 3, b). Este mecanismo de control por colocalización funciona gracias a que diferentes sensores son responsables de reclutar a ATR-ATRIP y TopBP1 a los puntos de ssDNA, y son necesarios para activar la señalización de ATR. Por un lado, RPA (Replication Protein A) recubre el ADN de cadena sencilla estabilizándolo (Walter and Newport, 2000), y, además de tener funciones esenciales en reparación y replicación, es la encargada de reclutar al par ATR-ATRIP (Zou and Elledge, 2003). ATRIP interacciona con RPA a través de su extremo N-terminal, aunque no se puede descartar que existan otros dominios de unión, u otras proteínas que recluten a ATRIP, que sean suficientes para atraer y activar el complejo (Ball et al., 2005; Namiki and Zou, 2006). Por otro lado, el complejo 9-1-1, compuesto por Rad9, Hus1 y Rad1 es el encargado de atraer a TopBP1. El complejo 9-1-1 reproduce la estructura de anillo

de PCNA y es atraído y cargado por Rad17-RFC (Bermudez et al., 2003; Medhurst et al., 2008) en el ADN de doble cadena adyacente a ssDNA recubierto por RPA (Majka et al., 2006; Zou et al., 2003). Rad9 posee una cola C terminal no homóloga a PCNA que es necesaria para reclutar a TopBP1 (Delacroix et al., 2007; Furuya et al., 2004; Lee et al., 2007), y que interacciona también con la subunidad grande de RPA (Xu et al., 2008), poniendo de esta forma al complejo ATRIP-ATR y a TopBP1 en contacto. Un dominio específico de TopBP1 (aa 978-1286) es necesario para activar ATR (Kumagai et al., 2006) a través de la interacción, por un lado, con el PRD de ATR y por otro con ATRIP (Mordes et al., 2008a), lo que evidencia la mutua dependencia de estas proteínas para funcionar como un complejo activo (figura 4). Además, se ha demostrado que este dominio es suficiente para activar ATR *in vitro* en presencia de ATRIP, independientemente

de otros factores como RPA, Rad9 o incluso la presencia de ssDNA. Esta facultad abrió la posibilidad, desarrollada en esta tesis, de idear un sistema para activar la DDR a través de ATR sin el uso de agentes genotóxicos. La mitad C terminal de TopBP1 humana, donde está situado el dominio de activación de ATR, está altamente conservada en organismos superiores y, sin embargo, tanto TopBP1 de *S. pombe* (Cut5) como de *S. cerevisiae* (Dpb11) carecen de ella. No obstante, recientemente se

ha demostrado que Dpb11 es capaz, al igual que el complejo Ddc1-Rad17-Mec3 (homólogo del humano 9-1-1), de activar catalíticamente ATR (Mordes et al., 2008b; Navadgi-Patil and Burgers, 2008). Además de necesitar todos estos factores para activarse genéricamente, ATR requiere de un adaptador específico, Claspin, para fosforilar a uno de sus substratos fundamentales, Chk1 (ver más adelante, checkpoints) (Liu et al., 2006b). Además de la actividad de ATR, los niveles de Claspin están estrictamente regulados en función de la fase del



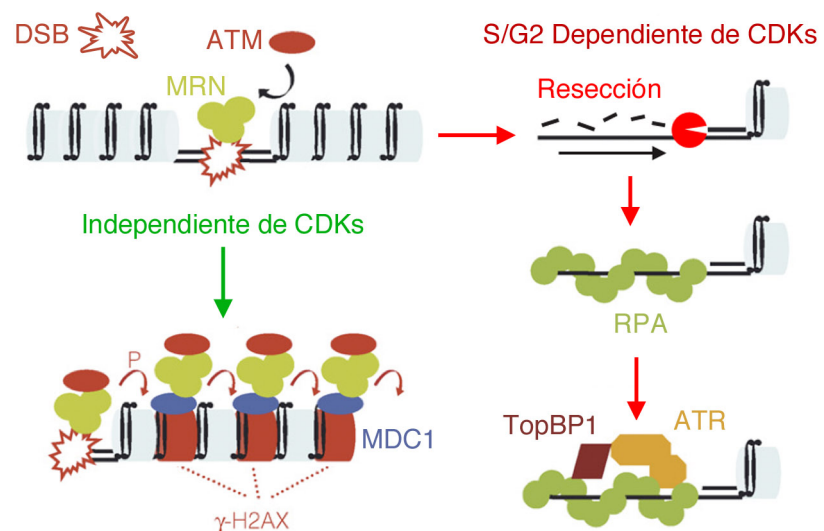
**Introducción. Figura 4 | Dominio de activación de TopBP1 (TAD)** **a**, Ensayo in vitro que muestra como el dominio de activación de ATR se encuentra entre los aminoácidos 972-1279 de XTopBP1, 978-1286 en la proteína humana (adaptado de Kumagai et al., 2006). **b**, El dominio de activación se encuentra entre los BRCT 6 y 7 de TopBP1. La parte C terminal de la proteína que contiene este dominio sólo está presente en organismos superiores, no en levadura (adaptado de García et al., 2005)

ciclo, de forma que la activación de Chk1 está rígidamente restringida a S y G2 por ambos mecanismos (Mailand et al., 2006b).

### 3.4. Cooperación entre ATM, ATR y DNA-PKcs

Las funciones de ATM y ATR se complementan para cubrir el espectro de respuesta a los diferentes tipos de daño severo que puede sufrir el ADN. Sin embargo, a pesar de que el reclutamiento específico a distintas lesiones les otorga un papel no redundante en la respuesta al daño, existe una clara interconexión entre ellas. Las células ATM  $-/-$  exhiben una deficiencia severa en la activación de los checkpoints G1/S, intra S y G2/M en respuesta a IR, que se hace más evidente a dosis bajas y a tiempos cortos (Girard et al., 2002; Xu et al., 2002). En otras palabras, otras quinasas son capaces, aunque con limitaciones, de suplir la carencia de ATM en los checkpoints en respuesta a IR. La evidencia de que tanto ATM como DNA-PKcs fosforilan a H2AX en respuesta a IR (Stiff et al., 2004) fue complementada con dos recientes trabajos en los que quedaba demostrado que DNA-PKcs suple algunas de las funciones de ATM en su ausencia fosforilando sus substratos (Callen et al., 2009b; Tomimatsu et al., 2009). Sin embargo, mientras que en condiciones normales ATM enmascara a DNA-PKcs en funciones de señalización, la comunicación entre ATM y ATR para una eficiente señalización es esencial. En respuesta a IR, ATM regula la activación del checkpoint en G2 estimulando a ATR (Adams et al., 2006; Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006), mecanismo que implica el

procesamiento de los DSB para reclutar a ATR (figura 5). En un mecanismo dependiente de actividad CDK (Huertas and Jackson, 2009), exclusivamente en S y G2 se produce la rápida resección de los DSB por diferentes helicasas y exonucleasas para generar ssDNA (Huertas and Jackson, 2009; Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008), orquestrándose una transición de ATM a ATR que ocurre físicamente en los DSB.



**Introducción. Figura 5 | Cooperación entre ATM y ATR en respuesta a DSB.** En todo el ciclo ATM es reclutada a los DSB, disparando su actividad. Además, en S y G2 la actividad CDK promueve la resección de los DSB, generando ssDNA que recluta a ATR a través de RPA (Adaptado de Bartek & Lukas, 2007).

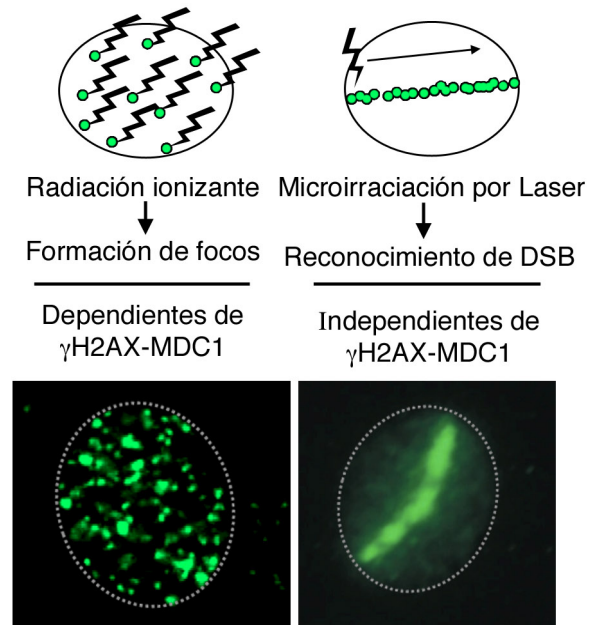


ATM y el complejo MRN localizados inicialmente en la ruptura estimulan el comienzo de la resección de los extremos 5' libres. Conforme el DSB se va transformando en ssDNA se induce un creciente reclutamiento de ATR acompañado de la progresiva expulsión de MRN y desactivación de ATM (Shiotani and Zou, 2009). Además de la resección, ATM promueve también la activación de ATR fosforilando a TopBP1, lo que aumenta su capacidad alostérica (Yoo et al., 2007). El ssDNA provoca el reclutamiento de RPA, el complejo 9-1-1, y TopBP1, lo que dispara la actividad catalítica de ATR para inducir el checkpoint en G2. Este proceso es necesario para la reparación de los DSB por recombinación homóloga (posible en S y G2).

## 4. Amplificación de la señal

Una vez ATM y ATR se localizan en los puntos de daño y se activan, toda una serie de eventos que son fundamentales para la amplificación de la señal se desencadenan en las inmediaciones de la lesión. En esta fase es fundamental el papel de los mediadores de la respuesta. Las funciones precisas de estas proteínas son muy diversas y en muchos casos escasamente conocidas. Así, el término “mediador” es automáticamente asignado a aquellas proteínas con un papel relevante aunque de función desconocida en la respuesta al daño en el ADN. Un hecho característico de los mediadores, y de otras proteínas de señalización y reparación, es que comparten la facultad de ser reclutados y concentrarse en los DSB o en los segmentos de ssDNA, en agregados denominados focos. Los focos son visibles mediante inmunofluorescencia como puntos nucleares brillantes, lo que constituye una de las más potentes herramientas en el laboratorio para el estudio de la DDR (Figura 6). En respuesta a radiación ionizante, la generación de DSB induce focos llamados IRIF (*Ionising Radiation Induced Foci*). Esta concentración de proteínas requiere que una amplia sección de la cromatina alrededor de la lesión sea compactada y modificada para servir de superficie de anclaje. Los primeros eventos implicados son la fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 (forma a la que se denomina  $\gamma$ H2AX) (Celeste et al., 2002; Rogakou et al., 1998) y su interacción con Mdc1 (Lukas et al., 2004a). En ausencia de  $\gamma$ H2AX o Mdc1, factores fundamentales de la respuesta como 53BP1, BRCA1 y Nbs1 pierden su capacidad de concentrarse en IRIF (Celeste et al., 2002; Stewart et al., 2003), pero no la de ser reclutados exclusivamente a las rupturas, hecho que puede visualizarse cuando se genera una gran concentración de DSB en áreas discretas del ADN (Limoli and Ward, 1993) (figura 6). La acumulación de estas proteínas en focos es entonces un fenómeno posterior y funcionalmente distinto a su capacidad de acudir a los DSB (Celeste et al., 2003), pero es necesaria para una

correcta y eficiente respuesta al daño (Fernandez-Capetillo et al., 2002). Según el modelo actual, ATM es reclutada directamente a los extremos de ADN del DSB por el complejo MRN, fosforilando H2AX en las inmediaciones. ATM genera así una marca epigenética en las inmediaciones de la ruptura a la que se une directamente MDC1 (Stucki et al., 2005). Mdc1 recluta al complejo MRN a través de Nbs1 (Lukas et al., 2004a), interacción en la cual es fundamental un dominio de MDC1 altamente fosforilado (Chapman and Jackson, 2008; Melander et al., 2008; Spycher et al., 2008). Consecuentemente, el complejo MRN recluta a ATM de forma que ahora puede fosforilar a H2AX en posiciones adyacentes, generándose una reacción en cadena que amplifica la señal (Lou et al., 2006). Así el eje  $\gamma$ H2AX-MDC1-Nbs1 provoca que el radio de actividad de ATM se vaya extendiendo hasta zonas muy distantes a la ruptura (Rogakou et al., 1999), y es un pivote fundamental en la generación de la arquitectura de los IRIF. Aunque se sabe que MDC1 es necesario para el reclutamiento de factores esenciales como 53BP1 y BRCA1 en IRIF, el mecanismo no es directo. Otras modificaciones postraduccionales adicionales a la cascada de actividad quinasas tienen un papel primordial en el reclutamiento de estos mediadores de la respuesta. En la formación de focos de BRCA1 y 53BP1 es fundamental la ubiquitinación de histonas en las inmediaciones de las rupturas (van Attikum and Gasser, 2009). RNF8 y RNF168 son dos E3-ubiquitin-ligasas que, en conjunto a la E2-conjugasa UBC13, son necesarias para la formación de IRIF de 53BP1 y BRCA1. RNF8 interacciona directamente con MDC1 fosforilado (4 sitios N terminal) y promueve la ubiquitinación de las histonas H2A, H2B y H2AX (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007) que son reconocidas por RNF168/UBC13. Ésta poliubiquitina residuos clave de H2A (Doil et al., 2009; Stewart et al., 2009), reacción que recluta a BRCA1 a través de los motivos de unión a ubiquitina de Rap80 (Kim et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang and Elledge, 2007; Wang et al., 2007). Se sabe que tanto RNF8 como RNF168 forman IRIF dependientes de H2AX y MDC1, y son necesarios para BRCA1 y 53BP1. Sin embargo, no se conoce con exactitud qué interacciones son las que provocan el reclutamiento de 53BP1.



**Introducción. Figura 6 | IRIF y DSB.** La radiación ionizante genera DSB puntuales de forma aleatoria, mientras que la microirradiación con láser concentra un gran número de rupturas y permite visualizar aquellas proteínas que acuden directamente a los DSB.

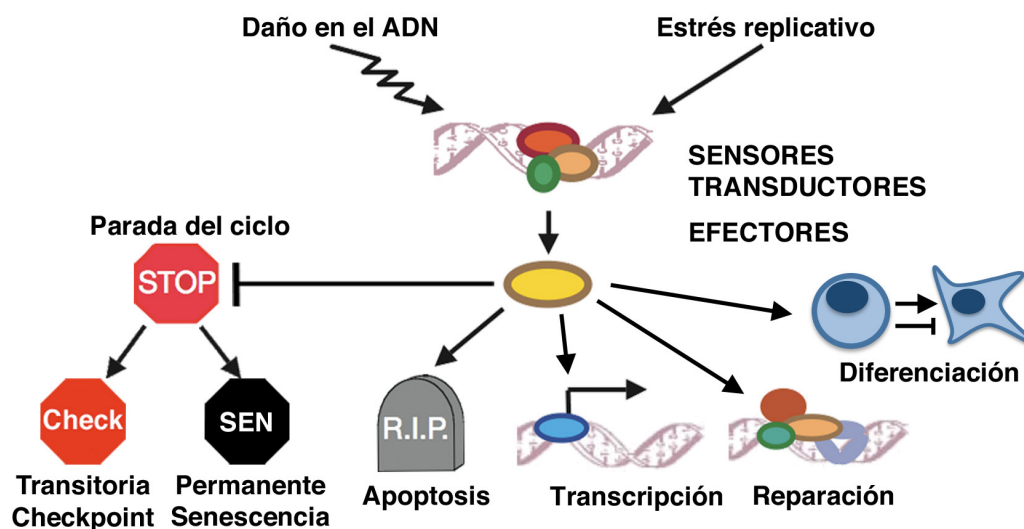
Por otro lado, en respuesta a estímulos que inducen la activación de ATR a través de la generación de ssDNA se pueden observar otros factores formando focos, aunque su arquitectura varía substancialmente de otros IRIF en respuesta a DSB. Cuando se perturban las horquillas y se exponen largos filamentos de ssDNA o cuando se genera ssDNA por la resección de los DSB, la acumulación de RPA es visualizable por inmunofluorescencia. Esta es, a diferencia de los IRIF, independiente de H2AX, debido a que RPA sirve de puente de anclaje directo al ADN de cadena simple (Liu et al., 2006a). Consecuentemente, ATR-ATRIP y otros factores como Rad9 y TopBP1 son reclutados en focos.

La relevancia de los IRIF en la respuesta al daño es sin embargo limitada. En primer lugar, la incapacidad para formar IRIF, revelada por los modelos deficientes de MDC1 y H2AX, es dispensable para la vida, aunque provoca un fenotipo de inestabilidad genómica (Celeste et al., 2002; Lou et al., 2006). Sin embargo, otros factores como Nbs1, Rad50, Mre11 o BRCA1, que necesitan a H2AX y MDC1 para concentrarse en IRIF, son esenciales para la supervivencia celular (Hakem, 2008). Por lo tanto, estas proteínas tienen otras funciones independientes de la formación de focos que son indispensables para la célula, evidencia que está ligada a la capacidad de estos factores de acudir directamente a los DSB incluso en ausencia de H2AX y MDC1 (Celeste et al., 2003; Stewart et al., 2003). Esto sugiere que los eventos esenciales en la resolución de DSB ocurren estrictamente en las rupturas y que la formación de IRIF es sólo necesaria para la total eficiencia de la respuesta al daño. Por un lado, aunque no hay evidencias mecánicas, la formación de IRIF en los lindes de la lesión podría ayudar a estabilizar rupturas sucias o difíciles hasta que son reparadas, dado que no todos los DSB que se generan son cortes limpios en el ADN. Sin embargo, la mayoría de evidencias apunta a que la función principal de los IRIF es la eficiente señalización del daño. La progresiva concentración de transductores de la señal en las rupturas parece ser necesaria para alcanzar el nivel necesario de señalización para detener el ciclo (Yamauchi et al., 2008). La ausencia de H2AX, MDC1 o 53BP1 provoca una deficiencia en los checkpoints que, como en el caso de ATM, únicamente se pone de manifiesto en respuesta a dosis bajas de irradiación (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Stewart et al., 2003; Xu et al., 2002). El tamaño de los IRIF va creciendo conforme su número disminuye, sugiriendo que el fenómeno de concentración es necesario para mantener el arresto, y un indicador de capacidad señalizadora. Por otro lado, los IRIF siempre aparecen en un número proporcional a la dosis de irradiación, de forma que a partir de cierto número su función sería redundante. Así, la formación de IRIF por defecto en cada DSB sería como un mecanismo de seguridad que asegura que el umbral de señalización necesario para una eficiente DDR siempre se alcance.



## 5. Efectos de la respuesta al daño en el ADN

La misión fundamental de la DDR es desplegar las funciones metabólicas necesarias para que cualquier tipo de daño o alteración en el ADN sea reparado eficientemente evitando cualquier perjuicio para la célula. Además de llevar a cabo la reparación propiamente, la DDR ha de ser capaz de detener el ciclo si la célula está proliferando para evitar que el daño sea transmitido a las células hijas antes de ser correctamente reparado. No obstante, otras respuestas son necesarias en circunstancias excepcionales para asegurar la integridad del genoma y eliminar el peligro potencial de alteraciones incorrectamente reparadas. Cuando la cantidad de daño resulta intolerable para las capacidades celulares al no poder asegurarse su total eliminación, la DDR también tiene el poder de desencadenar un programa de muerte o apoptosis. En otras circunstancias, cuando la célula siente la presencia de daño constante que altera de forma crónica la progresión del ciclo, la DDR puede detener definitivamente la proliferación mediante la entrada en senescencia. Todas estas respuestas implican cascadas de señalización que activan rápidamente rutas moleculares completas, así como programas transcripcionales para la expresión de factores esenciales en funciones diversas.



**Introducción. Figura 7 | Efectos de la DDR.** Esquema de los efectos de la DDR sobre el metabolismo celular. Cada respuesta depende del contexto celular, del tipo y de la cantidad de daño (adaptado de Zhou & Elledge, 2001).

Recientemente se han encontrado evidencias de un papel de la DDR alternativo a la inducción de apoptosis o senescencia en respuesta a daño exógeno. A diferencia de como ocurre en otros tejidos, la DDR resultante del daño acumulado tras dosis altas de IR en células madre melanocíticas despliega una respuesta de diferenciación, lo que limita su capacidad de

autorenovación y promueve el envejecimiento tisular (Inomata et al., 2009). Por otro lado, este mismo trabajo apunta que ante niveles normales de daño endógeno la DDR actúa previniendo la diferenciación prematura, poniendo en evidencia de nuevo cómo, en función de la cantidad de lesiones que se debe afrontar, la DDR puede proteger o sacrificar a la célula como vía preventiva.

A parte de esta función novedosa, las respuestas troncales de reparación, parada del ciclo, senescencia y apoptosis se describen brevemente a continuación.

### 5.1. Reparación

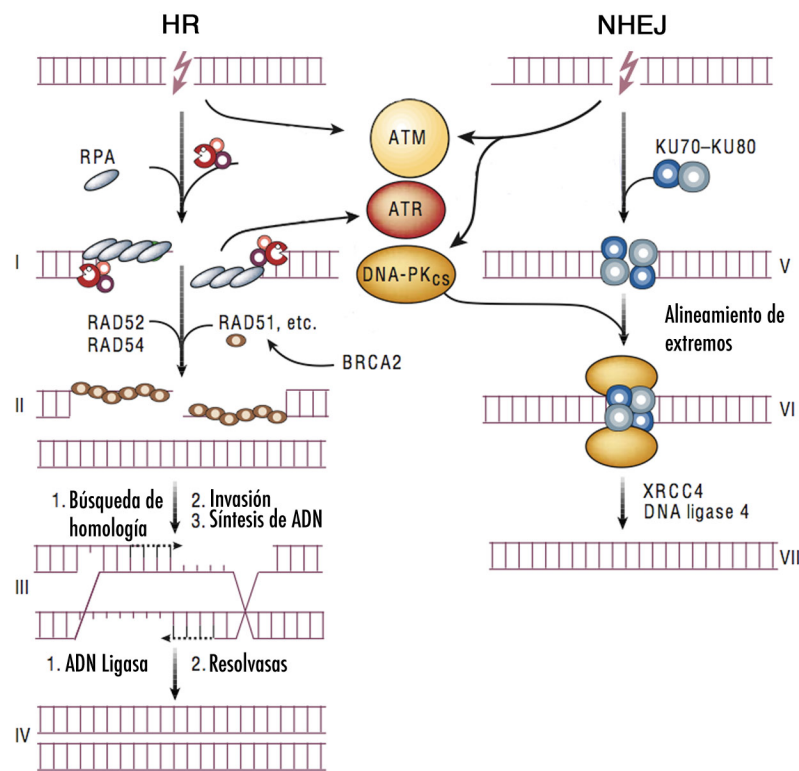
Además de los mecanismos que vigilan constantemente la generación de modificaciones puntuales en las bases, como NER (reparación por escisión de nucleótidos), BER (reparación por escisión de bases) y MMR (reparación de desapareamientos), la célula dispone de dos vías fundamentales para reparar alteraciones estructurales como las rupturas de doble cadena (Hoeijmakers, 2001). Estas vías, NHEJ y HR, difieren en aspectos esenciales que las hacen complementarias y primordiales para el eficiente mantenimiento de la integridad del genoma. Esquemáticamente, NHEJ es el método más simple, ya que lleva a cabo la religación de los extremos rotos, y funciona a lo largo de todo el ciclo celular, siendo básico para la reparación de DSB en G1. Cuando una cromátida hermana está disponible como resultado de la replicación (S y G2), la célula recurre preferencialmente a la recombinación homóloga o HR, que utiliza la secuencia de nucleótidos almacenada en la cromátida hermana intacta como molde. Mientras que NHEJ es ligeramente mutagénico, ya que en el proceso de religación algunas bases pueden perderse o añadirse en la ruptura, HR es un mecanismo exento de errores, aunque, por contra, involucra a más factores y es más complicado molecularmente (Figura 8).

NHEJ es un mecanismo rápido y altamente eficaz de reparar rupturas. Los DSB son reconocidos por Ku70 y Ku80, que forman heterodímeros con afinidad por los extremos rotos de ADN, manteniéndolos unidos (Dyran and Yoo, 1998; Pang et al., 1997). El dímero Ku70/Ku80 recluta a DNA-PKcs formando el complejo activo DNA-PK (Gottlieb and Jackson, 1993), que mediante autofosforilaciones y fosforilando a otros miembros de la ruta, dirige la correcta progresión de la reparación (Downs and Jackson, 2004). La ruptura es físicamente religada por un complejo formado por DNA Ligasa IV y XRCC4 (Hefferin and Tomkinson, 2005). A parte de los DBS que ocurren aleatoriamente a lo largo del genoma, las rupturas programadas que tienen lugar en la recombinación V(D)J y en la de cambio de clase o CSR

(Class Switch Recombination) durante la maduración linfática también necesitan de la vía de NHEJ para religarse (Casellas et al., 1998; Nussenzweig et al., 1996). Así, además de una acusada radiosensibilidad, la falta de componentes de NHEJ provoca una severa inmunodeficiencia tanto en humanos como en ratones.

La recombinación homóloga implica más pasos que NHEJ para llevar a cabo la reparación. En primer lugar, para la búsqueda de homología en la cromátida hermana es necesaria la generación de ssDNA, por lo que los DSB son reseccionados para generar largos segmentos de ADN de cadena simple con extremos 3' (Hion, 2000). Diferentes helicasas y exonucleasas responsables de este proceso han sido identificadas en los últimos años, aunque no está clara la exacta sucesión de eventos en que cada una está

implicada (Huertas and Jackson, 2009; Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). Tras la resección, el ssDNA es recubierto por RPA, dando paso a la búsqueda de homología en la cromátida hermana. Para ello el segmento de ssDNA debe invadir el ADN de cadena doble (desplazando las hebras complementariamente unidas), por lo que RPA es substituida por otra proteína con capacidades invasivas, Rad51 (Benson et al., 1994), fenómeno que es facilitado por Rad52 (New et al., 1998). El modelo más intuitivo que describe los pasos siguientes en la HR sugiere que la maquinaria de replicación se encarga de rellenar la secuencia que falta utilizando los extremos de ssDNA como cebadores. De esta forma se llega a una estructura en 'unión de Holliday', que posteriormente debe ser resuelta para separar ambas cromátidas. Este proceso, que involucra una endonucleasa para crear una ruptura tansitoria y una ligasa que la une después, necesita de una actividad enzimática 'resolvasa' (West, 2003). Esta enzima ha sido



**Introducción. Figura 8 | Esquema de reparación de DSB: HR y NHEJ.** Se representan los pasos fundamentales de la reparación de DSB por las dos vías (adaptado de Hoeijmakers, 2001).

recientemente identificada en humanos después de muchos años de intensa búsqueda por la comunidad científica (Fekairi et al., 2009).

De un gran número de factores implicados en HR, algunos son de extrema importancia en la supresión tumoral en humanos. BRCA1 y BRCA2 son necesarios para reclutar eficientemente a Rad51, y su ausencia compromete seriamente la HR (Welsh et al., 2000; Yuan et al., 1999). De ambas se sabe mecanísticamente que BRCA2 regula directamente la carga de Rad51 en los filamentos de ssDNA, bloqueándolo físicamente en un proceso dependiente de actividad CDK (Esashi et al., 2005). Cuando se genera daño en el ADN, la DDR elimina la fosforilación que mantiene a BRCA2 y Rad51 unidos, permitiendo que Rad51 se cargue eficientemente en el ssDNA. Otra evidencia de síndromes relacionados con la HR es la anemia de Fanconi. Los componentes de la ruta de Fanconi-Anemia (FA) resuelven entrecruzamientos intra-cadena mediante HR. Los diferentes factores actúan en pasos sucesivos que convergen en la monoubiquitinación de FANCD2, necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta, y que es dependiente de la actividad de ATR (Andreassen et al., 2004a; Ho et al., 2006; Wang et al., 2004).

## 5.2. Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo activo de muerte celular programada. Esta respuesta se dispara en respuesta al daño en el ADN cuando el nivel y gravedad de lesiones superan un umbral de tolerancia. Este principio es utilizado en terapia contra el cáncer, de forma que las células malignas son eliminadas mediante el uso de altas dosis de daño inducidas por ejemplo mediante IR. Sin embargo, en algunos casos las células cancerosas son insensibles a ciertos estímulos apoptóticos, por lo que el estudio de las vías moleculares implicadas en este proceso es determinante para el uso y desarrollo de terapias más efectivas. Diferentes agentes genotóxicos pueden provocar apoptosis en células de mamífero como consecuencia de su capacidad de bloquear la replicación drásticamente y generar, directa o indirectamente, DSB. Como una respuesta más de la DDR, la señal inducida por las PIKKs es la responsable principal de iniciar el proceso apoptótico. La decisión de optar por la muerte celular, y no por otras respuestas menos severas, viene determinada fundamentalmente por la intensidad de la señal, que es proporcional al número y gravedad de lesiones, y por la sensibilidad de cada tipo celular al daño. Sin embargo se desconoce en detalle cómo esta aparente dualidad está regulada. No obstante, al ser un proceso activo, la capacidad para señalizar eficientemente es necesaria para una correcta respuesta apoptótica. Así, la apoptosis por DSB se ve reducida en ausencia de ATM o Chk2 (Duchaud et al., 1996; Hirao et al., 2000b). Aunque existen

respuestas apoptóticas independientes, el efector principal de la apoptosis en respuesta a DSB es p53. Al ser activado por la DDR, induce la expresión de genes implicados directamente en desencadenar los procesos fisiológicos necesarios para la muerte celular, como Puma, Noxa y Bax (Miyashita and Reed, 1995; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000). Estos genes cooperan en la polarización de la membrana mitocondrial y la salida de citocromo C al citosol. Este fenómeno provoca la formación de diversos complejos protéicos apoptóticos, y culmina con la activación de las caspasas y la ejecución de la muerte celular.

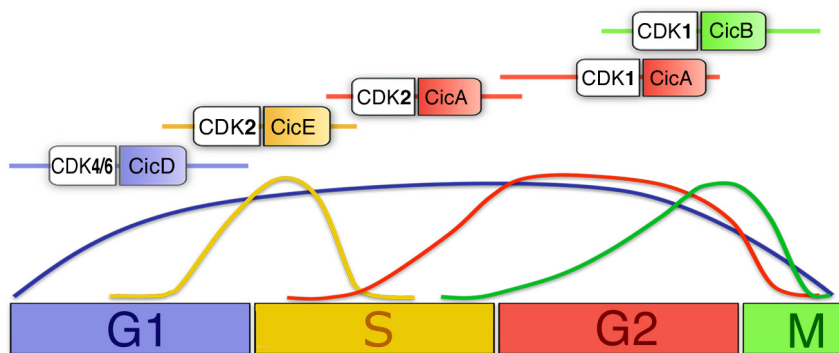
### **5.3. Control del ciclo celular**

#### **5.3.1. El ciclo celular**

El ciclo celular en eucariotas está dividido en diferentes fases separadas por transiciones sometidas a un rígido control. Las dos fases fundamentales para el metabolismo del ADN son la de síntesis o S, en la que se da la replicación del ADN, y la de mitosis o M, en la que se segregan los cromosomas replicados y se desencadena la citocinesis. Completan el ciclo dos fases intercaladas, G1 y G2 (del inglés gap o intervalo), que sirven a la célula para prepararse a la síntesis y la segregación del material genético respectivamente. En organismos pluricelulares la progresión del ciclo celular se decide por un balance entre señales promotoras e inhibidoras, de forma que en situaciones en que no se requiere una proliferación celular continua, como en tejidos sólidos de un organismo adulto, las células entran en un estado fuera del ciclo, denominado G0 o quiescencia. Sólo en determinadas circunstancias una célula quiescente puede reentrar en el ciclo a través de G1, pero en esencia es un estado reversible. La unidireccionalidad del ciclo celular implica que determinados puntos sean considerados de no retorno una vez la célula los ha superado, como el conocido punto de restricción al final de G1. Por ello las diferentes fases del ciclo celular están separadas por transiciones estrictamente reguladas, de forma que una nueva fase no comienza hasta que se dan todos los requisitos que definen que la fase anterior se ha completado. De esta forma, perturbaciones severas como el daño en el ADN inciden en estas transiciones bloqueando la progresión del ciclo hasta que la integridad del genoma está asegurada.

## Introducción

La fuerza motriz del ciclo celular son las CDKs o quinasas dependientes de ciclinas. Las diferentes CDKs fosforilan y activan un amplio espectro de substratos que llevan a cabo las acciones necesarias para completar las diferentes fases del ciclo. Las CDKs son una familia de serina/treonina quinasas, cuyo número es mayor en función de la complejidad del organismo. En levadura una sola quinasas, Cdc2 (CDK1 en mamíferos), es capaz de dirigir la progresión del ciclo celular a través de las diferentes fases. En humanos, por el contrario, existen hasta 13 quinasas diferentes (Malumbres and Barbacid, 2005), aunque sólo 4 están implicadas directamente en el control del ciclo celular. CDK1 es la CDK mitótica, y las otras tres CDK2, CDK4 y CDK6 funcionan en interfase. Los niveles de las CDKs durante el ciclo son prácticamente constantes y en situación monomérica son inactivas. Su actividad es regulada por cofactores, denominados ciclinas, que son expresados cuando la actividad de una determinada CDK se requiere y subsecuentemente degradados cuando la actividad de la CDK ya no se necesita (Murray, 2004). En mamíferos las diferentes ciclinas se dividen en 4 clases, de tipo A, B, D y E. CDK4 y CDK6 se asocian con ciclinas tipo D para atravesar el punto de restricción en la fase G1 y CDK2 unida a ciclina E induce la entrada en fase S. Ciclina A



**Introducción. Figura 9 | Actividad de las diferentes CDKs y niveles de ciclinas a lo largo del ciclo.** Se muestra esquemáticamente las CDKs que están preferencialmente activas en cada fase del ciclo.

substituye a ciclina E como cofactor de CDK2 durante la replicación, y finalmente CDK1 unida principalmente a ciclina B es responsable de la progresión hasta mitosis y su ejecución. Aunque este modelo clásico puede ser en muchos escenarios la aproximación más cercana a la realidad, CDK1 es

capaz de completar el ciclo en mamíferos y promover el desarrollo embrionario en ausencia de las demás CDKs (Santamaría et al., 2007). Las otras 3 CDKs son necesarias para completar el desarrollo y generar un animal adulto fértil, pero sólo la falta de CDK1 es letal a nivel celular (Malumbres and Barbacid, 2009).

Las células han desarrollado métodos para regular rápidamente la actividad de las CDKs independientemente de las ciclinas, y que en muchos puntos son inducidos por la DDR para controlar el ciclo en caso de daño en el ADN. Los más importantes son la existencia de fosforilaciones inhibitoras en las CDKs, la expresión de proteínas inhibitoras de CDKs, y el



preciso control de los niveles de reguladores clave del ciclo mediante mecanismos activos de degradación proteolítica.

Wee1 y Myt1 son quinasas inhibidoras de CDKs. La quinasa Wee1 fosforila constitutivamente a CDK1 y CDK2 en la Tyr-15, inhibiendo su actividad y previniendo la entrada en fase S y mitosis, y Myt1 fosforila a CDK1 en la Thr-18 (Booher et al., 1997; Parker and Piwnicka-Worms, 1992). Estas fosforilaciones inhibitorias son a su vez contrarrestadas por las fosfatasas de la familia cdc25 (Boutros et al., 2006), estableciéndose un equilibrio que es rápidamente desplazado cuando otros estímulos inciden sobre él, pudiendo decidirse así la progresión en el ciclo o la parada en función de la actividad catalítica predominante. Este rápido control sobre la actividad CDK es especialmente relevante en la respuesta temprana de arresto del ciclo en G1 y G2.

Existen diferentes genes en el genoma de mamíferos que codifican proteínas con la facultad de inhibir la actividad de las CDKs mediante interacción física. Estos inhibidores de CDKs (CKIs) se pueden dividir en dos grupos basándose en su estructura y especificidad (Sherr and Roberts, 1999). En primer lugar la familia CIP/KIP de CKIs comprende a p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> y p57<sup>KIP2</sup>. Estas proteínas inhiben los complejos de CDK2 y CDK4/6 uniéndose tanto a la CDK como a la ciclina e interfiriendo en el sitio catalítico (Russo et al., 1996). p21 es una diana transcripcional de p53 con un papel importante en la inducción de los checkpoints (Brugarolas et al., 1995; el-Deiry et al., 1993; Elledge et al., 1996), especialmente en el mantenimiento del arresto (Sherr and Roberts, 1999). p27 sin embargo es regulado mediante el control de su estabilidad (Pagano et al., 1995), y tiene un papel fundamental en el arresto tardío en respuesta a daño persistente (datos del laboratorio, en prensa). La segunda familia de inhibidores se define como de clase INK4 (inhibidores de CDK4), a la que pertenecen p15<sup>Ink4b</sup>, p16<sup>Ink4a</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> y p19<sup>Ink4d</sup>, también conocido como p19<sup>ARF</sup>. A diferencia de la familia CIP/KIP, estas proteínas desestabilizan el complejo CDK-ciclina, uniéndose específicamente a las CDKs. Las dianas principales de las proteínas INK4 son CDK4 y CDK6, por lo que su función se restringe a la fase G1 del ciclo. En general los efectos inhibitorios de los CKIs se definen por su abundancia en el núcleo, por lo que su transcripción y degradación está estrictamente regulada (Murray, 2004).

Incluyendo a las ciclinas, la aparición y desaparición controlada de reguladores del ciclo son fenómenos fundamentales para el correcto transcurso de la división celular. Dos extensos complejos, SCF y APC, controlan el procesamiento de reguladores del ciclo por la vía de degradación dependiente de ubiquitina a través del proteasoma. El complejo SCF (Skp1-Cdc53/Cullin-F-box) presenta una actividad constitutiva que es importante en diferentes puntos a lo largo de todo el ciclo (Nakayama and Nakayama, 2005). Funciona como una gran

conjugasa(E2)/ligasa (E3) de ubiquitina, determinando la especificidad por el sustrato mediante diferentes proteínas F-box (E3), muy abundantes en el genoma humano (Cenciarelli et al., 1999). Fosforilaciones específicas en las proteínas diana determinan su afinidad por su respectiva F-box, siendo así marcadas para degradación. Las F-box Skp2 y  $\beta$ -Trcp son las más importantes en el control de reguladores del ciclo. Skp2 tiene un papel clave en la salida de G1, pues controla la degradación de p27, p21 y ciclina D entre otros (Carrano et al., 1999; Yu et al., 1998), mientras que  $\beta$ -Trcp ejerce su papel principal en la transición G2-M, regulando los niveles de factores clave como, cdc25a, Claspin y Wee1 (Busino et al., 2003; Mailand et al., 2006a; Watanabe et al., 2005). El complejo APC (Anaphase Promoting Complex) es estructuralmente similar a SCF, pero sólo se asocia a dos E3-ligasas, cdh1 y Cdc20, que, a diferencia de las F-box, no necesitan de otras modificaciones postraduccionales para unir a sus dianas (Harper et al., 2002; Peters, 2002). En cambio, APC está inactivo durante un amplio periodo de la interfase debido a la ausencia de cdc20 (Kramer et al., 2000), inactivación de Cdh1 (Lukas et al., 1999) y la existencia de inhibidores específicos (Reimann et al., 2001). Una vez activo, APC dirige la transición desde mitosis hasta G1 por degradaciones sucesivas de sustratos. Desde la mitosis temprana, primero a través de Cdc20, APC degrada a ciclina A, ciclina B y Securina, para ya en anafase a través de su unión a Cdh1, degradar al propio Cdc20 y a quinasas mitóticas claves como Plk1 y Aurora A (Peters, 2002). APC extiende su actividad en G1, manteniendo así el nivel de estas proteínas bajo y degradando a Skp2, lo que elimina la actividad de SCF y permite que CKIs como p27 se acumulen. Sólo cuando la actividad CDK inhibe a APC, SCF recupera sus niveles y, mediante la proteólisis de sus dianas, da paso a la fase S.

La célula toma dos decisiones irreversibles en el transcurso del ciclo celular. Estas transiciones se dan al final de las fases *gap*, y son los puntos clave en que la célula inicia la síntesis de ADN y la segregación cromosómica. Cuando suficientes niveles de ciclina D promueven la actividad de CDK2/CDK4, la fosforilación de Rb libera al factor de transcripción E2F (Bartek and Lukas, 2001), evento que promueve la expresión de genes esenciales para la entrada en fase S. Entre otros E2F induce la rápida expresión de ciclina E (Geng et al., 1996), activando CDK2, lo que desencadena una serie de procesos que llevan a la célula a la completa entrada en fase S. Por un lado CDK2/ciclinaE ayuda a CDK4/6 en la fosforilación de Rb, eliminando finalmente la capacidad de esta proteína de inhibir a E2F. Mediante la inhibición de APC, CDK2/ciclinaE promueve la estabilización de ciclina A, que se encarga de mantener la actividad de CDK2 durante la fase S (Morgan, 1997). Finalmente, CDK2/ciclinaE estimula la actividad de proteínas importantes para la síntesis de ADN como Cdc45, que carga la polimerasa en los orígenes de replicación (Arata et al., 2000; Zou and Stillman, 1998).



Cuando la replicación del ADN ha concluido, la célula se prepara en G2 para la entrada en mitosis. Los niveles de ciclina B aumentan progresivamente, formando complejos inactivos (por la fosforilación de Wee1) con CDK1 en el citoplasma. Al final de G2 CDK1/ciclinaB se translocan al núcleo y su actividad es reinstaurada por la progresiva eliminación de las fosforilaciones inhibitorias, tanto por la acción de la familia de fosfatasas cdc25 como por la degradación de Wee1 por SCF/ $\beta$ -Trcp. Este doble mecanismo de activación de CDK1 está promovido por Plk1 (van Vugt and Medema, 2005), por lo que se le considera la quinasa que enciende el interruptor de entrada en mitosis. Tanto Plk1 como la propia CDK1 fosforilan por un lado a Wee1, marcándolo para degradación, y a las fosfatasas cdc25, aumentando su actividad, lo que genera un ciclo de retroalimentación positiva que posibilita que CDK1 alcance el máximo de actividad rápidamente (Nigg, 2001; Watanabe et al., 2005). Finalmente APC, estimulada por CDK1 (Ubersax et al., 2003) regula la terminación de la mitosis como se ha descrito.

### **5.3.2. Control transitorio del ciclo: checkpoints**

Para asegurar que el material genético celular está intacto en el momento de las transiciones en G1 y G2, la respuesta al daño en el ADN es capaz de retrasar la progresión en el ciclo modulando transitoriamente los mecanismos de regulación de actividad de las CDKs. En respuesta a lesiones en el ADN, la DDR puede detener el ciclo en la frontera entre G1 y S, entre G2 y M, y ralentizar la replicación durante la fase S (Abraham, 2001). Estas barreras se denominan puntos de control o checkpoints G1/S, G2/M e intra-S.

La ejecución de la señal generada por ATR y ATM en respuesta al daño es llevada a cabo por dos quinsas efectoras, Chk1 y Chk2. La fosforilación de Chk2 en la treonina 68 es llevada a cabo específicamente por ATM (Matsuoka et al., 1998). ATR es a su vez responsable de fosforilar a Chk1 en las serinas 317 y 345 (Liu et al., 2000; Zhao and Piwnicka-Worms, 2001), aunque no se ha probado formalmente que estas modificaciones sirvan molecularmente para activarla. En conjunto, las cuatro quinsas constituyen la fuente señalizadora que permite detener el ciclo celular en respuesta a las alteraciones en el ADN. Aunque están jerárquicamente por debajo de las quinsas transductoras, Chk1 y Chk2 son esenciales para la correcta activación de los checkpoints. Mecánicamente, mientras que ATM y ATR junto a mediadores de la respuesta funcionan como bases emisoras en los puntos de daño o estrés replicativo, Chk1 y Chk2 son activadas en la lesión para después extender su función a todo el nucleoplasma (Lukas et al., 2003; Smits et al., 2006). De esta forma la señal es transmitida

desde la lesión hasta el conjunto de reguladores del ciclo que deben ser alcanzados para desactivar eficientemente las CDKs.

Aunque al principio ATM y ATR responden específicamente a diferentes tipos de daños estructurales, la señal que generan para detener el ciclo es jerárquicamente canalizada e integrada hasta alcanzar efectores comunes, ya que el objetivo final es el mismo, desactivar las CDKs. De esta forma se distinguen 2 vías paralelas y fundamentales por un lado en el rápido arresto del ciclo y por otro en el mantenimiento del mismo. La DDR induce la rápida destrucción de las fosfatasas Cdc25, de las cuales la principal en el control de la actividad CDK es Cdc25A (Boutros et al., 2006). La fosforilación de Cdc25A en respuesta al daño, fundamentalmente por Chk1 (Jin et al., 2003; Xiao et al., 2003), la marca para ser degradada por SCF/ $\beta$ -Trcp (Busino et al., 2003; Mailand et al., 2000), lo que lleva a la rápida inhibición de CDK1 y CDK2. La capacidad de la DDR de desactivar las CDKs de forma casi instantánea es especialmente importante en el bloqueo de la entrada en mitosis. Por otro lado, una respuesta más lenta pero igualmente esencial es mediada por la activación del factor de transcripción p53. En respuesta al daño p53 sufre múltiples modificaciones postraduccionales (Appella and Anderson, 2001). Principalmente, ATM y ATR fosforilan a p53 en la serina 15 (Canman et al., 1998; Tibbetts et al., 1999), mientras que Chk1 y Chk2 lo hacen en la serina 20 (Hirao et al., 2000a; Shieh et al., 2000). Estas modificaciones inducen un aumento en los niveles de p53, desestabilizando la interacción con su E3-ligasa, Mdm2 (Ashcroft et al., 1999; Shieh et al., 1997), lo que evita que sea ubiquitinado y degradado por el proteasoma. Como resultado, y consecuencia también de otras modificaciones como la acetilación (Dornan et al., 2003), la capacidad de p53 de transactivar sus genes diana aumenta considerablemente (Dumaz and Meek, 1999), induciendo la expresión de p21, fundamental para el mantenimiento del arresto mediante la inhibición de CDK2/ciclinaA-E (Sherr and Roberts, 1999). La acumulación y activación de p53 ocurre más lentamente que la degradación de Cdc25A, pero tanto su actividad como la de sus efectores persiste por un largo periodo de tiempo. Ambas vías son fundamentales para la inactivación global de las CDKs, aunque tienen diferente protagonismo en cada uno de los arrestos inducidos por la DDR.

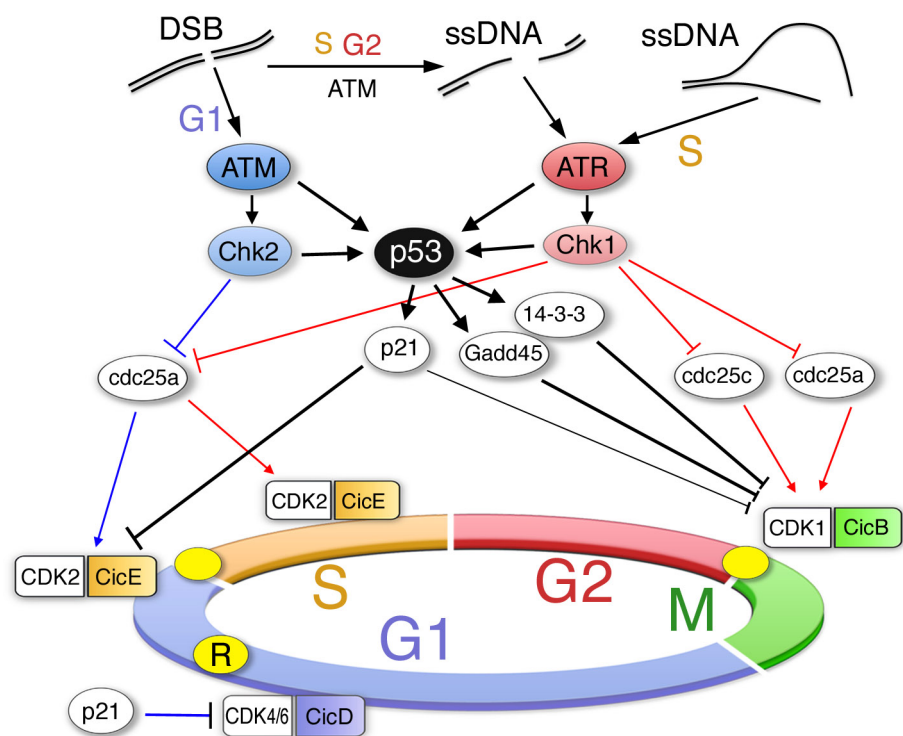
Según el modelo actual (Lukas et al., 2004b), la parada en G1/S es controlada temporalmente por la fosfatasa Cdc25A y mantenida por p53. Ambas actividades, por la rápida degradación de Cdc25A y por la inducción de p21, convergen en la inhibición de CDK2/ciclinaE, aunque son precisamente sus diferencias en velocidad de respuesta lo que abre dos ventanas de actividad. La rápida degradación de Cdc25A en respuesta a daño (Mailand et al., 2000) permite una casi instantánea caída de la actividad de CDK2/ciclinaE. Por otro lado, la activación transcripcional

de p21 por p53 es un mecanismo que, aunque más lento, es necesario para el mantenimiento del arresto después de la transitoria inhibición por Cdc25a (Bartek and Lukas, 2001), y representa la barrera fundamental para la efectividad del checkpoint G1/S en respuesta a daño. De hecho, es un punto esencial en la supresión de la transformación tumoral, ya que alrededor de un 50% de los tumores humanos tienen un checkpoint G1/S defectuoso por inactivación de p53 y otro gran porcentaje tienen alterada esta ruta por otras vías, como por sobreexpresión de Mdm2 (Levine et al., 1991; Vogelstein et al., 2000). Mientras que la conexión entre las quinasas de la DDR y p53 es clara, el conocimiento del control sobre Cdc25A es aún difuso. La quinasa que fosforila preferencialmente cdc25A es Chk1, y esta actividad es fundamental en el checkpoint premitótico. Sin embargo, la actividad de Chk1 está fuertemente restringida a S y G2 (Jazayeri et al., 2006; Mailand et al., 2006a), por lo que otras quinasas, como Chk2 (Falck et al., 2001) podrían estar implicadas.

Esta regulación sin embargo es clara en el caso del checkpoint en G2. Este arresto previene la entrada en mitosis de células que han sufrido lesiones tanto durante G2 como en la progresión de la fase S.

La diana fundamental del eje Chk1-Cdc25A es el complejo clave en la entrada en mitosis, CDK1/ciclinaB. Como en el arresto en G1, el mantenimiento a largo plazo de un efectivo bloqueo de la entrada en mitosis se sustenta en vías adicionales a la rápida degradación de Cdc25A. De nuevo el eje p53/p21 tienen un papel esencial en este caso (Bunz et al., 1998), aunque p21 es considerado, a

diferencia de en el caso de los complejos CDK2/ciclinaE-A, como un inhibidor pobre de CDK1/ciclinaB (Harper et al., 1995). Otros productos transcripcionales de p53 han sido



**Introducción. Figura 10 | Checkpoints en respuesta al daño en el ADN.** Esquema del control transitorio del ciclo por las quinasas ATM y ATR. En G1 la parada es inducida por ATM-Chk2, mientras que en G2 ATM promueve la activación de ATR-Chk1.

propuestos como efectores del checkpoint G2/M, como GADD45 y 14-3-3 (Taylor and Stark, 2001).

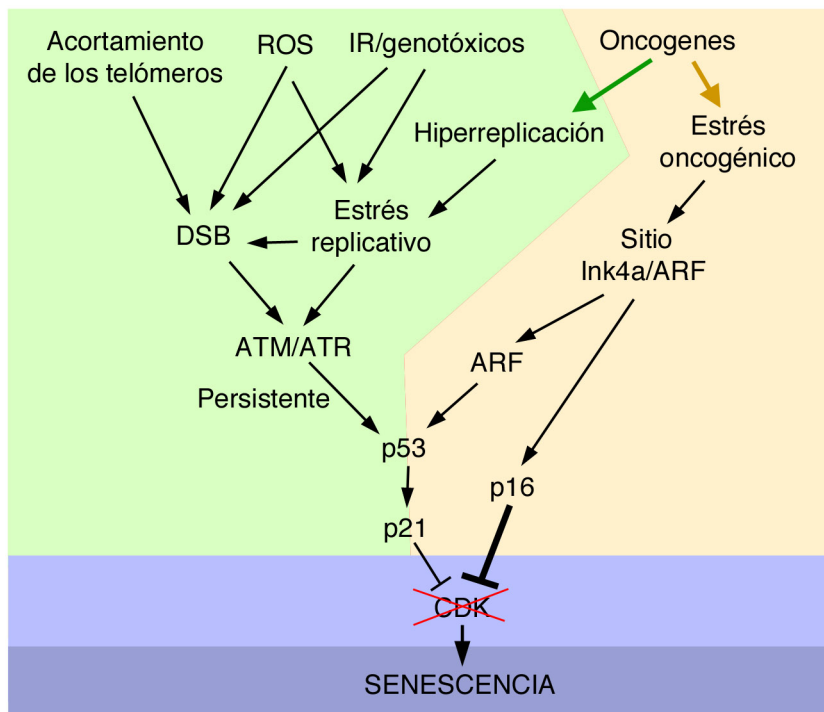
La cooperación entre estas dos rutas paralelas sirve de base de algunas terapias anticancerosas. Mediante la inhibición de Chk1 se persigue la sensibilización de tumores deficientes en p53 (Busby et al., 2000; Hirose et al., 2001; Wang et al., 1996), al inhabilitar por completo el checkpoint en G2 y arrastrar a las células a la citocinesis con cantidades intolerables de daño genómico.

### 5.3.3. Parada permanente del ciclo: senescencia

La senescencia celular fue inicialmente descrita hace 4 décadas cuando por primera vez se observó que las células normales tienen una habilidad limitada para proliferar en cultivo (Hayflick, 1965). Tras una primera fase de intensa proliferación, la tasa de crecimiento fue decayendo hasta que todas las células dejaron de dividirse, aunque permanecieron viables y metabólicamente activas durante semanas. Este proceso se denominó “efecto Hayflick”, y dado que muchas células cancerosas son capaces de proliferar indefinidamente en cultivo, fue propuesto como un mecanismo supresor tumoral (Smith and Pereira-Smith, 1996). La posibilidad de una proliferación ilimitada supone una seria amenaza para la homeostasis celular en organismos superiores, por lo que en la evolución se han desarrollado mecanismos que detectan excesos en el crecimiento celular, tanto en número de divisiones como en velocidad proliferativa. La red de estímulos que pueden provocar la entrada en senescencia es amplia, aunque en mayor o menor medida todos responden a desequilibrios indicativos de una amenaza para la integridad del ADN y el riesgo de sufrir una transformación celular, y son, en definitiva, potencialmente oncogénicos.

Una de las causas del arresto permanente es la activación del llamado reloj celular, sentido por el acortamiento de los telómeros. En cada división las células somáticas pierden de 50 a 200 pares de bases por la imposibilidad de finalizar la replicación en los extremos de los cromosomas (Harley et al., 1990). Cuando el número de divisiones excede un cierto número, las estructuras protectoras ‘*T-loop*’ de los cromosomas ya no se pueden formar, quedando expuestos los extremos de ADN libres. Estos telómeros disfuncionales son reconocidos como DSB y son capaces de disparar una DDR (D’adda Di Fagagna et al., 2003; Martens et al., 2000; Takai et al., 2003) que provoca el arresto permanente, denominado senescencia replicativa. Así, otras formas de daño permanente y/o severo pueden inducir senescencia de forma prematura, como el provocado por estrés oxidativo en cultivo (Parrinello et al., 2003), o el

derivado del uso continuado de agentes genotóxicos (Di Leonardo et al., 1994; Te Poele et al., 2002). Hace poco más de una década se observó por primera vez que fibroblastos silvestres en cultivo entraban prematuramente en senescencia en respuesta a una forma oncogénica de Ras (H-rasV12) (Serrano et al., 1997). Este trabajo fue resultado de experimentos de transformación celular en fibroblastos murinos, en los que se buscaba identificar posibles supresores tumorales a través de ensayos de cooperación con oncogenes. La senescencia provocada por Ras venía acompañada de la sobreexpresión de p53 y p16, ambos genes que en su ausencia promovían la transformación y proliferación descontrolada. Por esta razón se consideraron ambos como efectores fundamentales de la senescencia inducida por oncogenes o OIS (del inglés *Oncogene Induced Senescence*), aunque se desconocía la naturaleza exacta del estímulo que los oncogenes generan para provocarla (conocido como estrés oncogénico). *Grosso modo*, la OIS es una respuesta al estímulo proliferativo excesivo provocado por los oncogenes, y de hecho se ha observado también para efectores de la ruta de señalización de Ras, como RAF, MEK y BRAF cuando son sobreexpresados o expresados en formas oncogénicas (Lin, 1998; Michaloglou et al., 2005; Zhu et al., 1998). Durante años se ha intentado identificar la naturaleza del estrés oncogénico. p53 y p16 se encontraron sobreexpresados en senescencia replicativa, estableciendo un posible vínculo entre la OIS y la DDR (Beauséjour et al., 2003; Jacobs and de Lange, 2004; Stein et al., 1999). Recientemente se ha revelado que algunos oncogenes como Ras, CDC6, STAT5 o la Ciclina E provocan una



**Introducción. Figura 11 | Senescencia en respuesta a daño y a oncogenes.** Esquema de las causas principales y las rutas que controlan la entrada en senescencia por daño persistente y por oncogenes.

DDR asociada a la hiper-replicación del ADN en las células senescentes (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Estos resultados han reafirmado a la DDR como un posible efector también de la OIS en respuesta a determinados estímulos oncogénicos. Sin embargo, existe todavía una gran controversia acerca de qué vías moleculares son relevantes para la detección del ‘estrés oncogénico’, y

de cómo esa importancia se puede trasladar al posible papel supresor tumoral *in vivo*. Las vías moleculares responsables de la senescencia dependen en mayor o menor medida de la desactivación total de la actividad CDK mediada por p53 y/o Rb, en cuyo control son relevantes los productos del locus Ink4a/ARF, p16 y p19 (ARF). El papel de p19<sup>ARF</sup> en la regulación de la estabilidad y, por lo tanto, de la respuesta mediada por p53 (Pomerantz et al., 1998) es esencial en la inducción de senescencia. Los MEF ARF<sup>-/-</sup> no entran en senescencia por la acción de Ras (Palmero et al., 1998), y sin embargo ARF no es inducido por la DDR (Christophorou et al., 2006; Kamijo et al., 1997). Por lo tanto, al menos en MEF la respuesta a Ras es independiente de la generación de daño en el ADN, evidencia opuesta a las evidencias que vinculan OIS y DDR. Sin embargo, estos trabajos fueron realizados en células humanas (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007), y de hecho existen diferencias en la senescencia de células humanas y murinas que aportan complejidad a la comprensión de la OIS. Mientras que en ratón la desactivación de ARF o p53 es suficiente para eliminar la respuesta senescente, en la mayoría líneas primarias humanas se requiere también la pérdida de función de Rb/p16 (Lowe and Sherr, 2003). Otro fenómeno específico de senescencia en células humanas es la aparición de focos de heterocromatina denominados SAHF (del inglés *Senescence Associated Heterochromatin Foci*). Estos focos, donde se concentran proteínas específicas de heterocromatina como HP1 $\gamma$  y la marca H3K9 trimetilada, tienen la función de silenciar de forma permanente genes necesarios para la progresión del ciclo (Narita, 2003).

A parte de las evidencias en cultivo, diversos trabajos han detectado senescencia en modelos animales como respuesta a la transformación maligna (Braig et al., 2005; Collado, 2005; Dankort et al., 2007). Una aportación interesante de los modelos animales es la detección de una red transcripcional de tipo inflamatorio asociada a la OIS. La secreción de interleuquinas como IL-6 es necesaria para la OIS a nivel autónomo, pero dependiendo del contexto celular puede provocar una respuesta inflamatoria que promueva la proliferación celular circundante y la tumorigénesis (Kuilman et al., 2008). La senescencia es, por tanto, un mecanismo antitumoral que implica respuestas tanto a nivel autónomo como sistémico.

## 6. La DDR como mecanismo de supresión tumoral

El cáncer es una enfermedad de los genes. La enorme cantidad de mutaciones, duplicaciones, deleciones y reorganizaciones cromosómicas presentes en tumores avanzados no puede alcanzarse de forma espontánea. Uno de los motores para acelerar la adquisición de alteraciones en el genoma reside en el incorrecto funcionamiento de mecanismos de



reparación y/o señalización del daño. Defectos previos en la DDR predisponen a que la tasa de errores en el ADN debido al daño endógeno se multiplique, aumentando las posibilidades de que otros genes necesarios para el mantenimiento de la integridad sean alcanzados, generándose un efecto de degradación exponencial. Al mismo tiempo, estas mutaciones y alteraciones van progresivamente activando oncogenes y desactivando supresores tumorales hasta que la proliferación celular se descontrola. El estrés proliferativo generado por los oncogenes es una fuente de daño constante que contribuye a la transformación y progresión tumorales de forma decisiva.

Existe un gran número de síndromes severos humanos asociados a defectos en mecanismos de reparación/señalización, todos caracterizados por la predisposición a diferentes tipos de cáncer entre otras patologías (Tabla 1). Algunos de estos síndromes y otros muchos han sido reproducidos en modelos murinos, mediante la sustitución dirigida de genes específicos por versiones no funcionales, o mutadas en sitios esenciales para su actividad.

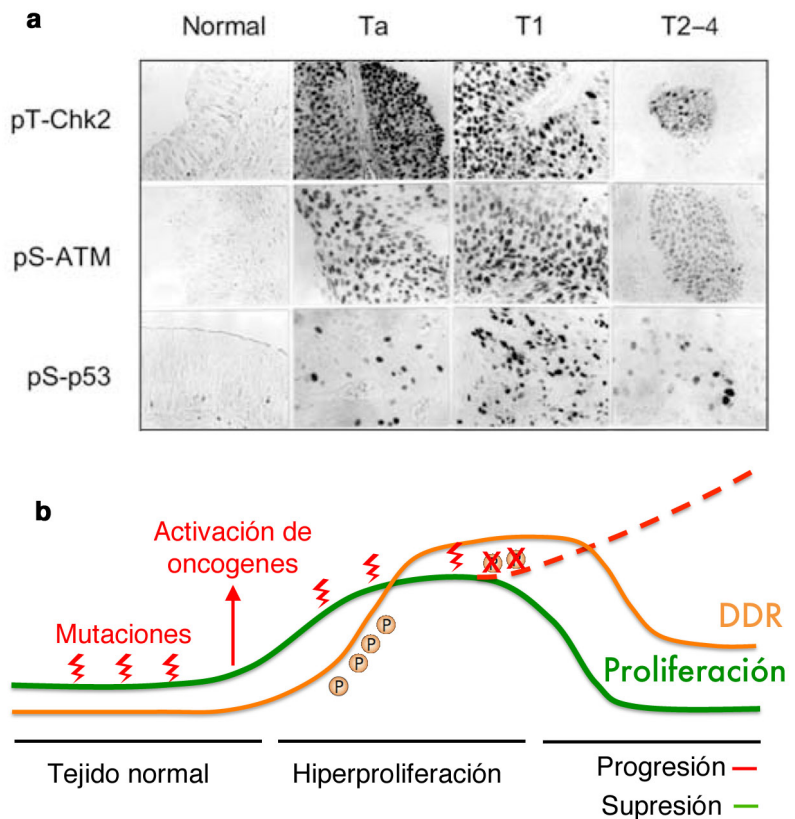
SÍNDROME	MECANISMO AFECTADO	TIPO DE INESTABILIDAD GENÓMICA	PREDISPOSICIÓN A CÁNCER
<b>Xeroderma Pigmentosum</b>	NER (TCR)	Mutaciones puntuales	Cáncer de piel inducido por UV
<b>Ataxia-telangiectasia (AT)</b>	Respuesta a DSB/reparación	Aberraciones cromosómicas	Linfoma
<b>Desorden ‘AT-like’</b>	Respuesta a DSB/reparación	Aberraciones cromosómicas	Linfoma
<b>Nijmegen breakage (NBS)</b>	Respuesta a DSB/reparación	Aberraciones cromosómicas	Linfoma
<b>BRCA1/BRCA2</b>	HR	Aberraciones cromosómicas	Cáncer de mama y ovario
<b>Werner</b>	HR/TLS	Aberraciones cromosómicas	Varios
<b>Bloom</b>	HR?	Aberraciones cromosómicas	Linfoma, leucemia y otros
<b>Rothmund–Thomson</b>	HR?	Aberraciones cromosómicas	Osteosarcoma
<b>HNPCC</b>	MMR	Mutaciones puntuales	Cáncer colorrectal

**Tabla 1.** Principales síndromes humanos con predisposición a cáncer asociados a defectos en mecanismos de mantenimiento de la integridad genómica

Como ocurre en humanos, en el caso de verse afectadas las vías de respuesta a daño severo como NHEJ, HR, la consecuencia más común a nivel genómico son las aberraciones cromosómicas, que promueven la delección y duplicación de genes y la translocación de cromosomas. Especialmente comunes son los casos de linfoma, debido a la ineficiente religación de las recombinaciones V(D)J y CSR en el desarrollo linfoide, lo que predispone a posibles translocaciones y desregulación de genes potencialmente oncogénicos. Los modelos animales, por otro lado, han revelado como la eficiencia específicamente en la señalización del daño, aparte de la reparación, es una fuente de inestabilidad genómica generalizada. Entendida

como tal, una eficiente DDR es necesaria para la correcta gestión de las lesiones que el ADN pueda sufrir en situaciones normales, por lo que alteraciones heredadas en sus rutas fundamentales predisponen al desarrollo prematuro de diversos tipos de cánceres. Aparte, se han encontrado evidencias de que la DDR es una barrera en los primeros estadios de la transformación tumoral, donde los primeros signos de proliferación descontrolada disparan la generación de estrés replicativo. Diversos trabajos apuntan a que específicamente en lesiones primarias la DDR funciona como un freno para la hiperproliferación de las células tumorales incipientes, al encontrarse signos de su sobreactivación (Bartkova, 2005; Gorgoulis, 2005; Nuciforo et al., 2007). Esta señalización de forma persistente provoca que, temporalmente, la tasa de división de este tipo de neoplasias sea incluso menor a la del tejido sano original (Halazonetis et al., 2008). De esta forma, la DDR podría suponer uno de los primeros obstáculos ante la activación de oncogenes, cuando las rutas de respuesta al daño están todavía intactas. La presión evolutiva del cáncer llevaría a la desactivación de genes esenciales en la respuesta antiproliferativa,

entre los cuales se destaca p53. Esta parada en la proliferación celular provocada por la DDR desencadena una respuesta antitumoral esencial en lesiones primarias a través de la inducción de senescencia, la cual no se observa en tumores más avanzados (Braig et al., 2005; Collado, 2005; Dankort et al., 2007). Aún no está claro sin embargo qué nivel de desequilibrios son necesarios para desencadenar una DDR de estas características *in vivo*. Por un lado están las evidencias de que diversos oncogenes disparan una senescencia en cultivo a través de la DDR, por la generación constante de daño asociado a la hiperreplicación del ADN



**Introducción. Figura 12 | Modelo de la DDR como mecanismo supresor tumoral. a,** Evidencias de activación de la DDR en tumores humanos primarios (Ta, T1), ausente en estadios más avanzados (T2-4). **b,** Modelo de actuación. La activación de oncogenes induce un aumento de la proliferación acompañado de estrés replicativo y daño genómico. La DDR se activa, suprimiendo la progresión del tumor. La progresiva acumulación de mutaciones puede desactivar este mecanismo, favoreciendo la evolución a estadios más agresivos.



(Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Sin embargo, la relevancia de estos resultados deben ser debidamente trasladadas al contexto de un tumor real. Así por ejemplo, la tumorigénesis asociada a la forma oncogénica de Ras, un modelo en que se observa además senescencia dependiente de p53, no se ve alterada por la ausencia de ATM (Efeyan et al., 2009). Éste dato apunta a que las tasas de daño asociado a replicación no son suficientes en muchos casos para disparar una respuesta drástica de la DDR. Sin embargo, cabe otra interpretación, ya que mientras que el papel de ATM es fundamental en la respuesta a DSB, con más tendencia a ocurrir en situaciones de estrés replicativo extremo como el cultivo celular, ATR es la quinasa responsable de mantener bajos los niveles de estrés en fase S, entendido como alteraciones que no desembocan en rupturas pero sí disparan una señal antiproliferativa. La imposibilidad, debido a su letalidad embrionaria, de usar modelos animales deficientes en ATR (o Chk1 como transmisor principal de la ruta) en un contexto de cáncer limita las posibilidades de responder a este tipo de preguntas fundamentales. En ese sentido, el modelo de Seckel desarrollado en nuestro laboratorio puede aportar luz sobre muchas de estas hipótesis (Murga et al., 2009). Desde otro punto de vista, las crecientes evidencias del papel esencial de ATR en el control de checkpoints y replicación colocan a esta quinasa como una señalizadora de capacidades análogas a ATM. Así, una cuestión primordial del papel de la DDR en oncogénesis es si estas quinasas son homólogas a la hora de desencadenar respuestas antitumorales como la senescencia, lo que colocaría a ATR en una posición cardinal en un campo que, por cuestiones técnicas, es marcadamente ATM-céntrico.



**OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

- Desarrollar un sistema inducible artificial para activar la DDR (ATR) sin generar daño en el ADN.
- Comprobar la funcionalidad de la DDR generada en ausencia de daño.
- Examinar si la activación persistente de la DDR induce la entrada en senescencia en células tanto primarias como inmortales en cultivo.
- Estudiar el potencial del sistema en la supresión tumoral en modelos transgénicos de ratón.
- Establecer posibles nuevas aplicaciones experimentales de la activación de ATR en ausencia de daño.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Clonaje

El fragmento correspondiente a los aminoácidos 978 – 1286 de la proteína humana TopBP1 fue clonado a partir del cDNA KIAA0259, obtenido del Kazusa DNA Research Institut. Se amplificó dicho segmento por PCR y se insertó por métodos tradicionales (digestión con enzimas de restricción, purificación de los fragmentos de ADN y ligación in vitro). La fusión con el receptor de estrógenos fue generada directamente insertando el fragmento TopBP1<sup>978-1286</sup> en la versión modificada del vector pMXPIE-ERT (cedido por el laboratorio de Andre Nussenzweig, NCI). En subsecuentes clonajes se aisló por PCR la fusión completa a partir de pMXPIE-TopBP1<sup>978-1286</sup>-ER y fue introducida por métodos equivalentes en los diferentes vectores. El plásmido pCAGGS y su versión ‘*puro*’ fue obtenido del laboratorio de Marcos Malumbres (CNIO). El plásmido pBS31 fue obtenido del laboratorio de Erwin Wagner (CNIO). El vector retroviral pBMN-YFP-FKBP-IRES/HcRed fue proporcionado amablemente por el laboratorio de Tom Wandless (Stanford, CA, EE.UU.).

## 2. Cultivo celular

Los diferentes líneas murinas utilizadas, deficientes en p53, Ink4a/ARF y ATM fueron descritos con anterioridad (Donehower et al. 1992; Barlow et al. 1996; Serrano et al. 1996). Los MEF primarios fueron obtenidos de embriones de ratonas a 13,5 días después del coito. Se cultivaron en DMEM con 15% de FBS y antibióticos (penicilina y streptomycin). De forma estándar se utilizaron incubadores con baja concentración de oxígeno (5%), salvo en ensayos de estrés oxidativo donde se usó concentración atmosférica. Las líneas NIH3T3 y 293T se cultivaron en DMEM con 10% FBS y penicilina-streptomycin.

Para la inducción del sistema TAD<sup>ER</sup> se suplementó el medio de cultivo con 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) de SIGMA a una concentración de 500 nM. Para el sistema TAD<sup>ER-DD</sup> se utilizó Shield-1 proporcionado por el laboratorio de Tom Wandless y obtenido de la compañía Cheminpharma (New Haven, CT., EE.UU.).

### **3. Infecciones y obtención de clones**

Para la producción de retrovirus no replicativos se contranfectaron los distintos vectores retrovirales (pMXPIE, pBMN, pBABE, pBABE-Cre) y pCL-ECO/pCL-Ampho en células 293T (proporción 1.5:1). Para infectar células murinas se usó la envuelta ECO y para humanas se combinó el uso de virus Ampho-trópicos y poli-trópicos (transfectando con pCL-Ampho y pVsVg en proporción 8:1). El vehículo de transducción fue en todos casos lipofectamina (Invitrogen). Se generó sobrenadante viral a partir de las 293T durante 48 horas (post-transfección). Una vez filtrado y suplementado con 8 µg/ml de polibreno, se incubaron con él las diferentes células un tiempo máximo de 8 horas. En caso de subsiguientes infecciones (hasta 3 en algunos casos) se usaron equivalentemente sobrenadantes frescos de 293T. 48 horas después de la infección se seleccionaron las células con 2 µg/ml de puromicina durante otras 48 horas. Los MEF utilizados en las infecciones eran todos de pase 0 ó 1.

Para obtener células con altos niveles de expresión del constructo, poblaciones con altos niveles de EGFP o HcRed fueron aisladas de las diferentes líneas con un separador (*sorter*) FACS Aria de Becton Dickinson.

Los clones 3T3<sup>T-ER</sup> y MCF7<sup>T-ER</sup> fueron obtenidos por dilución límite, seleccionados por expresión de EGFP y TADER y validados como se detalla en la sección de resultados.

### **4. Inmunofluorescencia HTM**

Para inmunofluorescencia clásica las células fueron crecidas sobre cristales en placa de 24 pocillos. Tras los tratamientos correspondientes fueron fijadas con 2% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras subsecuentes lavados (2 x 5' en PBS y 2 x 5' en solución de lavado (PBS - 0,25% BSA - 0,1% Tween20)), se bloquearon los cristales 30 minutos en solución de bloqueo (PBS - 3% BSA - 0,1% Tween20). Los anticuerpos primarios se incubaron en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (en función del anticuerpo) y los secundarios a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de cada anticuerpo se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución de lavado, para finalmente teñir el DNA con Dapi (1 minuto). Como último paso las preparaciones fueron fijadas en medio de montaje (mowiol). La adquisición de imágenes se realizó a temperatura ambiente en microscopios tanto de fluorescencia como confocales. Se usó un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager Z1 con tecnología Apotome y una cámara ORCA 1394

(Hamamatsu), y los microscopios confocales TCS SP2 y SP5 de Leica. Se utilizó aceite como medio de inmersión para obtener imágenes de alta definición con objetivos 40x, 63x y 100x (Leica y Zeiss).

Para inmunofluorescencia de alto rendimiento (HTM) las células se crecieron en placas de 96 pocillos con fondo de cristal mCLEAR (Greiner Bio-One). Se utilizaron los mismos protocolos para realizar las tinciones, salvo que las preparaciones se dejaron en PBS en vez de medio de montaje. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de lectura automatizada BD Pathway 855 BioImager (Beckton Dickinson) a temperatura ambiente y objetivos secos de 10 y 20 aumentos. El análisis de imagen fue llevado a cabo con el software AttoVision (Beckton Dickinson). Para los ensayos de focos se utilizó un microscopio automatizado Opera™ (Perkin Elmer) y análisis de imagen fue realizado con el software Acapella (Perkin Elmer).

El método que permite la adquisición de imágenes automáticamente y su posterior análisis se puede resumir brevemente. Un microscopio robotizado captura imágenes en distintos canales de diferentes puntos de una placa en función de una matriz personalizable. Una vez adquiridas las imágenes, el software de análisis permite delimitar regiones de interés en función de parámetros visuales, que se identifican como objetos individuales. En nuestro caso cada núcleo era reconocido por el contraste de intensidad de la tinción con DAPI respecto al fondo. De esta forma se genera una máscara de objetos que sirve para filtrar las imágenes obtenidas en todos los canales, pudiéndose analizar diferentes parámetros de cada canal y cada objeto, como la intensidad de fluorescencia por área. Así se acaba generando una lista de todos los objetos (núcleos) y los respectivos parámetros analizados. Posteriormente estos datos se pueden representar directamente, atribuyendo un punto a cada objeto, o en forma de medias para cada tratamiento o condición. En función del software se pueden hacer análisis más complejos, como la identificación de objetos dentro de otros objetos. Esta tecnología permite, primero, delimitar objetos en función de la tinción DAPI (núcleos), filtrar con esos objetos otro canal, y dentro de ellos buscar otros más pequeños (focos de 53BP1 reconocidos también por contraste de imagen). Así se puede visualizar cuántos objetos (foci) existen por núcleo, como se muestra en el apartado 5.1.

El EdU (5-etinil-2'-deoxiuridine) es un análogo del BrdU detectable por una reacción química con un fluoróforo con un grupo azida. De esta forma, al evitar la desnaturalización del ADN con ácido, su uso es especialmente útil en inmunofluorescencia. En cultivo se incubó de forma análoga al BrdU (ver más adelante), realizando la reacción con Alexa488-Azida durante 30

minutos a 37°C posteriormente a la fijación y permeabilización de las células. El protocolo de inmunofluorescencia se continuó de forma estándar después de esta reacción.

Para las tinciones se utilizaron los siguientes anticuerpos:  $\gamma$ H2AX y H3K93xMe (Upstate Biotechnology); 53BP1 (Novus Biologicals); SMC1-957P (Abcam); HP1 $\gamma$  (Chemicon); RPA (Lab Vision Corporation); CyclinA (Santa Cruz Biotechnology); MDC1 (NCI); ER (Unidad de anticuerpos monoclonales, CNIO). Para la inmunofluorescencia se usaron anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos Alexa 488, Alexa 594, o Alexa 647 (Molecular Probes).

## **5. Western Blotting**

Los extractos de proteínas se realizaron con tampón RIPA (Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4; NP-40 1%; Na-deoxycholate 0.25%; NaCl 150 mM; EDTA 1mM) o TNG (Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4; NaCl 200 mM; b-glicerofosfato 50 mM; Tween-20 1%; NP40 0,2%) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinin, leupeptin, pepstatin 1  $\mu$ g/ml y NaF 1 mM) y fosfatasas (Cocktail de inhibidores de fosfatasas I, SIGMA), en hielo durante 15 minutos y se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford. Para la electroforesis (SDS-PAGE) los extractos se complementaron con SDS y solución de carga (Invitrogen Loading Buffer 1x), b-mercapto-etanol y se hirvió durante 5 minutos. También se realizaron extractos totales para el análisis de histonas y proteínas de la cromatina, hirviendo directamente las células en solución de carga (SDS) 2x con b-mercapto-etanol.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE) en geles Nupage Novex (Invitrogen). Se utilizaron geles de gradiente de Bis-Tris acrilamida (4-12%) y de Tris-acetato (3-8%), con sus correspondientes tampones con SDS. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Polivinilidenofluoruro) Hybond (Amersham) mediante transferencia húmeda. Previamente a la incubación las membranas de forma estándar fueron bloqueadas en TBS-T (Tween20 0,1%) y 5% de leche (Asturiana) durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron incubados de 1 hora a 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en TBS-T o TBS-T con 5% de leche. Los anticuerpos secundarios se incubaron en TBS-T con 5 % de leche 1 hora a temperatura ambiente. Después de cada anticuerpo se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente de 10 minutos, con TBS-T en agitación. Todas las imágenes mostradas en esta tesis se obtuvieron en un escáner LICOR (Biosciences), que permite una adquisición digital lineal para análisis cuantitativos.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:  $\gamma$ H2AX y Chk2 (Upstate Biotechnology); Chk1-S345P, -S317P y Rad17-S645P (Cell Signaling); Chk1 (Novocastra); SMC1-957P y H2AX (Abcam); Smc1 (Bethyl); HP1 $\gamma$  (Chemicon); RPA (Lab Vision Corporation); Rb (BD-Pharmingen);  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich); FANCD2, p21 (F-5), p53 (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology). Para la inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa 680 y Alexa 800 (Molecular Probes).

## **6. RNAi**

Se diseñaron 3 oligos de siRNA diferentes para cada proteína (obtenidos de Ambion, Inc.). Células a un 30% de confluencia fueron transfectadas con los oligos a una concentración 50 nM usando DharmaFECT (Dharmacon). Los análisis fueron realizados 3 días después de la transfección. Los resultados fueron confirmados al menos por 2 siRNA independientes. En función del método más eficaz, se evaluó la eficiencia de cada siRNA mediante WB o RT-PCR.

## **7. Checkpoints, proliferación y senescencia**

Para analizar la parada en G1/S las células se incubaron con 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) durante un mínimo de 20 minutos hasta 3 horas (dependiendo del tipo celular). Se fijaron en etanol/PBS 70% y el DNA fue desnaturalizado con HCl 2M/0,5% Tritón X-100. De esta forma el BrdU incorporado se expone y puede ser marcado con un anticuerpo monoclonal anti BrdU-FITC, incubado en PBS/1%BSA/0,5% Tween20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendieron las células en PBS/1%BSA con yoduro de propidio, RNAsa (100 $\mu$ g/ml) y fueron analizadas por citometría de flujo en un BD FACSCalibur.

Para el checkpoint G2/M, se incubaron las células en Taxol (un máximo de 8 horas) previamente a la tinción. El taxol (o paclitaxel) inhibe la despolimerización de los microtúbulos bloqueando el movimiento de los cromosomas, con lo que previene la salida de mitosis. De esta forma se aumenta el número de células en mitóticas, con lo que se mejora la sensibilidad del ensayo. Una vez se establece que el checkpoint está activo se añadió taxol a las células. Seguidamente se incubaron con UCN.01 (300 nM). Los tiempos a los que cada droga se añadieron dependen del tipo de ensayo. Para la tinción las células fueron fijadas en etanol/PBS 70% y teñidas con anticuerpo monoclonal contra H3-S10P en PBS/BSA 1% y Alexa488 como secundario (ambos 1 hora a temperatura ambiente). Finalmente las células se resuspendieron en PBS/1%BSA con yoduro de propidio, RNAsa (100 $\mu$ g/ml) y se analizaron por citometría de flujo en un BD FACSCalibur.

Para los ensayos de proliferación se sembraron las células a baja confluencia en placa de 96 pocillos y se incubaron con 4-OHT de forma escalonada. Finalmente se tiñeron con cristal violeta al 0.2% en H<sub>2</sub>O/metanol 2%. Tras los lavados se liberó la tinción lisando las células con 1% SDS y se analizó en un lector de ELISA. Alternativamente se hicieron ensayos de proliferación clásicos, sembrando las células a diferentes densidades y realizando conteos en los días indicados después de sembrar.

Para la senescencia las células se tiñeron con kit de b-galactosidasa (Cell Signaling #9860), revelando la actividad enzimática a pH 6 por coloración azul de X-gal.

## **8. Ensayo de cometa**

Los ensayos de cometa (neutro y alcalino) se realizaron con un kit específico (Trevigen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esencialmente, las células son diluidas en agarosa de bajo punto de fusión después de los distintos tratamientos, y se les aplica un voltaje bajo durante 1 hora para extraer el ADN fragmentado de la célula. Posteriormente el gel de agarosa es teñido con SybrGreen y fotografiado en un microscopio de fluorescencia. La cuantificación del ensayo se llevó a cabo con un software específico, mediante el cual se identificaron manualmente parámetros morfológicos de las células que definen la proporción de ADN intracelular y extracelular.

## **9. Southern Blotting**

Los ensayos se realizaron siguiendo procedimientos estándar mediante kits comerciales (Amersham). Los pasos básicos se describen a continuación. El ADN genómico (extraído por métodos tradicionales a partir de colas, células o embriones) se digirió con las enzimas de restricción requeridas un mínimo de 12 horas. El material digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% a bajo voltaje hasta que el frente se desplazó un mínimo de 10 cm. Posteriormente se transfirió mediante difusión a una membrana Hybond N+ (Amersham), sobre la cual se realizaron las incubaciones con las sondas. Se utilizaron marcajes radiactivos y no radiactivos en función de la sensibilidad de la sonda. Para el marcaje radiactivo se incorporó  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP a una sonda previamente aislada mediante una reacción de replicación in vitro. Para el no radiactivo se utilizó fluoresceína. Las incubaciones se realizaron en solución de hibridación comercial (Amersham). Finalmente se detectó la presencia de la sonda

marcada por autorradiografía en membranas convencionales y por revelado digital de pantallas de detección *PhosphorImager*.





**RESULTADOS**



## RESULTADOS

### 1. Generación de un sistema inducible para la activación de la DDR

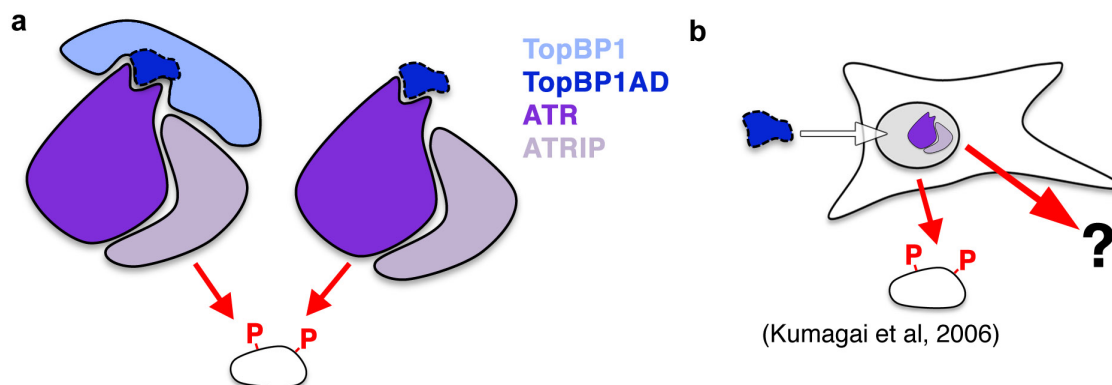
El trabajo presentado en los apartados 1, 2 y 3 de resultados fue publicado en la revista *Genes & Development* en Febrero de 2008, volumen 22(3), páginas 297-302. Se incluye dicha publicación como anexo a la tesis.

#### 1.1. Fundamento de la activación ectópica de ATR

En mayo de 2006 la revista *Cell* publicó el trabajo desarrollado por Kumagai y colaboradores en el que se presentaban evidencias de cómo se activaba catalíticamente el complejo ATR-ATRIP. Por entonces se conocían ampliamente los factores clave de la vía de señalización, como RPA, Rad9, Claspin o Topbp1, sin los cuales la actividad dependiente de ATR se ve gravemente comprometida. Sin embargo, la modificación postraducciona, interacción específica, o cambio conformacional que activaba el dominio quinasa de la proteína no se había determinado. El laboratorio de W. Dunphy demostró que TopBP1 es un activador alostérico clásico de ATR mediante ensayos *in vitro* (Kumagai et al., 2006).

En este trabajo se hicieron dos observaciones fundamentales. En primer lugar, como ya se había propuesto (Ball et al., 2005; Kim et al., 2005), la estimulación mediada por la interacción directa con TopBP1 no necesita la presencia de ADN de cadena simple recubierto de RPA. En segundo lugar, el resultado más importante obtenido por Kumagai et al. establece que la capacidad alostérica de TopBP1 reside en un dominio concreto de la proteína, localizado entre los aminoácidos 978 y 1286 en humanos (TopBP1AD de *Activation Domain*) (figura 1, a). Este dominio se encuentra en una zona de la proteína no caracterizada funcionalmente hasta la fecha, entre los dominios BRCT 6 y 7 de TopBP1.

Finalmente, en el trabajo de Kumagai y colaboradores se mostró que la sola transducción del dominio hTopBP1AD en células humanas provocaba la fosforilación de un sustrato de ATR (figura 1, b), por lo que vimos la posibilidad de diseñar un sistema que nos permitiera estudiar las consecuencias de la activación ectópica de ATR en células de mamífero sin necesidad del uso de agentes genotóxicos.



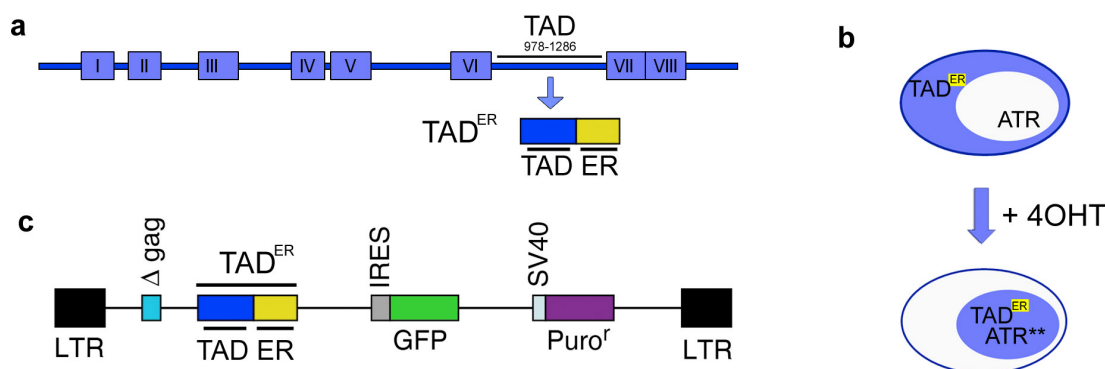
**Figura 1 | Activación alostérica de ATR por un dominio de TopBP1** **a**, Esquema de la activación de ATR por TopBP1 in vitro. Tanto la proteína completa como el dominio comprendido entre los aminoácidos 978-1286 (TopBP1AD) son capaces por sí solos de estimular catalíticamente el complejo ATR/ATRIP (en ausencia de ssDNA y RPA) **b**, Basándonos en la observación realizada por Kumagai y colaboradores, buscamos expresar TopBP1AD en células de mamífero y analizar las consecuencias de la activación de ATR en ausencia de daño.

## 1.2. Diseño de un sistema inducible

El objetivo era disponer de un vector con el que pudiéramos generar líneas estables en las que la activación de ATR a través de TopBP1AD fuera regulable. En vez de recurrir a sistemas de expresión condicional, dado que ATR es una proteína estrictamente nuclear, razonamos que su activación se podría controlar simplemente regulando la localización intracelular de TopBP1AD.

Para ello ideamos una proteína de fusión entre los aminoácidos 978 a 1286 de TopBP1 humano y el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos humano o ERT2 (figura 2, a). Desde sus primeras aplicaciones (Feil et al., 1996; Indra et al., 1999), este dominio ha dado excelentes resultados en el control de la localización intracelular en respuesta a 4-hidroxitamoxifeno (4OHT). Este compuesto es un antagonista sintético de estrógenos, utilizado ampliamente para ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. En ausencia de 4OHT el ERT2 se encuentra confinado al citoplasma, y en presencia de la droga sufre una rápida translocación al núcleo. De esta forma, sólo tras la adición de 4OHT al medio de cultivo la proteína de fusión TopBP1AD-ERT2 (TAD<sup>ER</sup> a partir de ahora) entraría en contacto con ATR, estimulando así su actividad quinasa (figura 2, b).

Como vector utilizamos pMX-PIE (pMX-*Puro*-*IRES*-*EGFP*), un plásmido retroviral con un IRES desde el cual expresa EGFP (*Enhanced GFP*) para monitorizar la integración del sistema (Ye et al., 1999). Este plásmido contiene además un casete de selección con puromicina que permite eliminar las células que no han integrado el transgén (figura 2, c).



**Figura 2 | Diseño del sistema de fusión TopBP1AD-ER** **a**, Esquema de TopBP1 humano. Los aminoácidos 978 a 1286 se fusionaron al receptor de estrógenos para generar la quimera TAD-ER. **b**, Funcionamiento esquemático del sistema. La quimera permanece fuera del núcleo en condiciones normales y se transloca en presencia de 4-OHT, activando a ATR. **c**, Esquema del vector retroviral pMX-PIE donde se clonó la quimera TAD-ER

## 2. Caracterización y funcionamiento del sistema en células primarias de mamífero

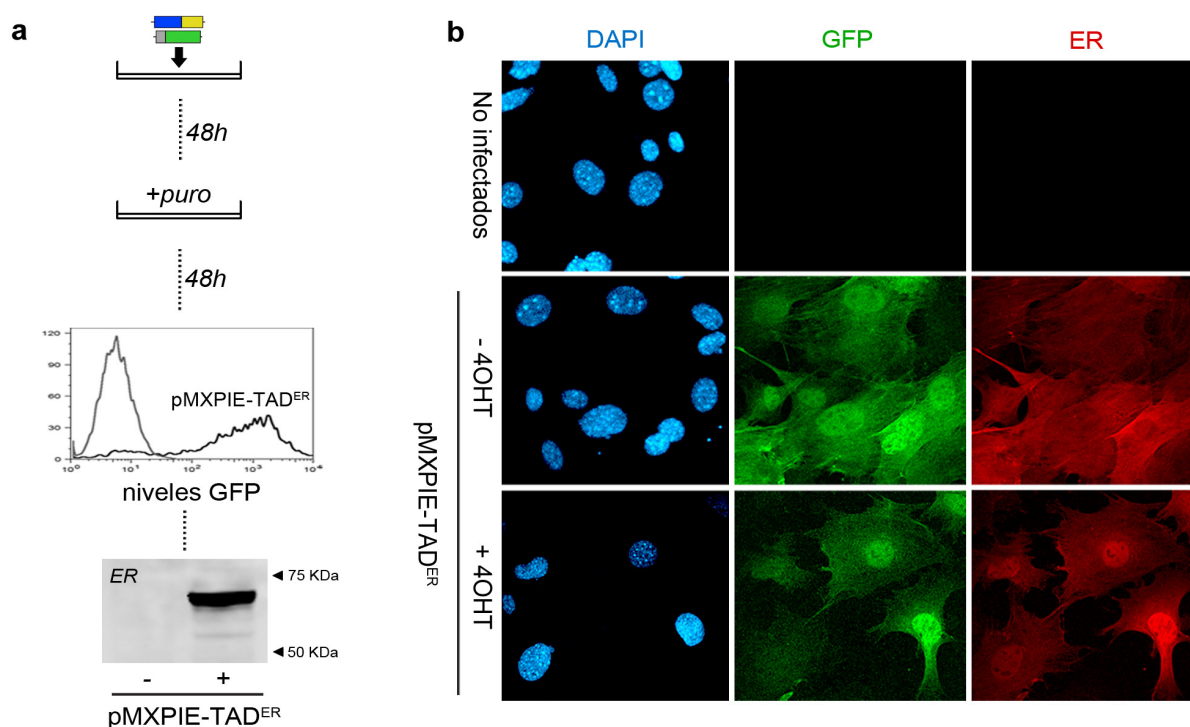
La inmensa mayoría de líneas celulares inmortales tienen las vías de control del ciclo celular inhabilitadas, y es presumible que una de las razones sea por alteraciones en las rutas de señalización del daño en el ADN. Dado que nuestro objeto de estudio es precisamente la activación de una de las quinasas fundamentales de la respuesta al daño, consideramos necesario probar nuestro sistema en un contexto genético inalterado. Como primer sistema experimental utilizamos fibroblastos embrionarios de ratón o MEF como modelo de células primarias. A pesar de estar utilizando el TopBP1AD humano, decidimos comenzar nuestros experimentos en MEF, ya que las formas humana y murina de TopBP1 presentan un alto nivel de homología, especialmente en los subdominios que contactan con el centro catalítico de ATR (Kumagai et al., 2006), por lo que consideramos que había una alta probabilidad de reactividad con la ATR murina (figura 3).



**Figura 3 | Secuencias del TAD murino y humano.** Alineamiento que muestra el alto nivel de homología entre el TAD humano y murino (casi un 75%), destacando la conservación de los subdominios (en naranja) putativamente responsables de la estimulación alostérica de ATR (según Kumagai et al, 2006).

## Resultados

Se infectaron MEF mediante procedimientos convencionales y, una vez seleccionados con puromicina durante 48 horas, se obtuvo una población policlonal con diferentes niveles de EGFP, como se pudo observar mediante citometría de flujo (figura 4, a). Para comprobar la expresión del transgén, se extrajo proteína y se analizó la presencia de la proteína quimérica por *western blotting* (WB). Utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra el ERT2 se detecta específicamente en células infectadas una banda de aproximadamente 70KDa, tamaño que coincide con la predicción en base a la secuencia de la fusión TAD<sup>ER</sup> (630 aminoácidos) (figura 4, a). Mediante inmunofluorescencia con el mismo anticuerpo pudimos detectar tanto la expresión del transgén en células EGFP positivas como su rápida respuesta tras la adición de 4OHT (figura 4, b).. Mientras que en células no infectadas no obtuvimos señal con el anticuerpo contra ERT2, en MEF infectados pudimos observar cómo en ausencia de droga la proteína se localiza principalmente, si no exclusivamente, en el citoplasma. En un tiempo mínimo de 20 minutos tras la adición de 4OHT al medio se observó como una gran parte del total de la proteína se relocizaba al núcleo. Por lo tanto pudimos concluir que la localización de la quimera TAD<sup>ER</sup> es controlable mediante la adición de 4-OHT al medio de cultivo.



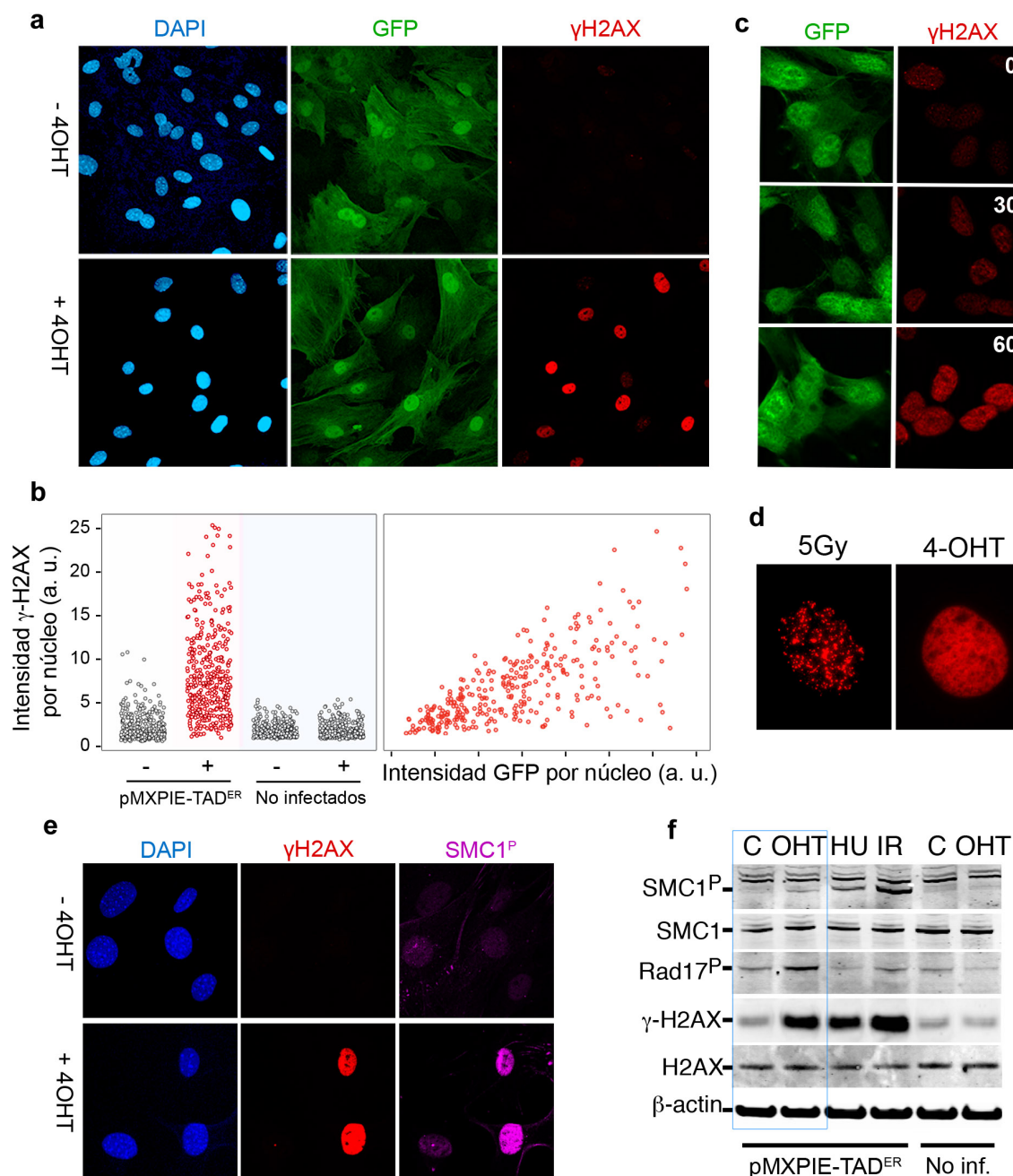
**Figura 4 | Funcionamiento del sistema inducible en MEF.** **a**, Esquema del protocolo experimental para obtener MEF infectados con pMXPIE-TAD<sup>ER</sup>. Se infectaron MEF y 48 horas después se seleccionaron con puromicina. Por citometría de flujo se comprobó la expresión del gen reportero GFP. Finalmente se analizó por WB la expresión de la quimera con un anticuerpo monoclonal para el ER. Se detectó una banda de 70Kda específicamente en MEF infectados, tamaño que se corresponde con el calculado para la quimera TAD<sup>ER</sup>. **b**, Inmunofluorescencia de MEF infectados y no infectados, en los que se comprobó la respuesta de la quimera TAD<sup>ER</sup>. Tras la adición de 4-OHT se observó cómo la localización del ER pasó a ser mayoritariamente nuclear.

## 2.1. Activación de ATR por la acción de la quimera TAD<sup>ER</sup>

Una vez comprobada la funcionalidad del sistema, determinamos si la translocación al núcleo de la fusión TAD<sup>ER</sup> era suficiente para inducir la actividad quinasa de ATR. Para ello analizamos si la adición de 4OHT al medio de cultivo se traducían en la fosforilación de sustratos de ATR. Uno de los sustratos más conocidos de las quinasas de respuesta al daño es H2AX (Fernandez-Capetillo et al., 2004). H2AX es rápidamente fosforilada en la serina 139 por ATR (forma a la que se denomina  $\gamma$ H2AX) en respuesta a estrés replicativo o RS<sup>1</sup> (*Replicative Stress*), por lo que la seleccionamos para monitorizar su activación (Ward and Chen, 2001). Evaluamos mediante inmunofluorescencia la aparición de la forma fosforilada de la histona, denominada  $\gamma$ H2AX, observando un aumento masivo de los niveles tras la adición de 4OHT (figura 5, a). El tratamiento no indujo ningún cambio en los niveles en MEF no infectados (figura 5, b). La aparición de  $\gamma$ H2AX era apenas detectable en los primeros 30 minutos tras añadir 4OHT, correlacionando con la cinética de translocación de TAD<sup>ER</sup> (figura 5, c). Mediante microscopía de alto rendimiento o HTM (High Throughput Microscopy) pudimos confirmar que la activación de ATR se estaba dando en todas las células, y que el grado de fosforilación de H2AX observado era proporcional al de expresión de GFP, indicando que la actividad quinasa era dependiente de los niveles de TAD<sup>ER</sup> como ya se había observado en los ensayos *in vitro* con ATR (Kumagai et al., 2006) (figura 5, b). Diferentes concentraciones de 4OHT no provocaron un mayor o menor nivel de traslocación de la quimera y fosforilación de H2AX, sino que sólo se vio afectada la cinética. El patrón de  $\gamma$ H2AX tras incubación con 4OHT era pan-nuclear y difuso, y contrasta con la distribución en focos típica causada por agentes genotóxicos como la radiación ionizante (figura 5, d). Esta observación encajaba con un hipotético fenómeno de activación de la quinasa deslocalizado y arbitrario por simple contacto con TAD<sup>ER</sup> nucleoplásmico, y no en puntos localizados de ssDNA. Además de  $\gamma$ H2AX, observamos un patrón equivalente de fosforilación en otros sustratos de la respuesta al daño, como Smc1 (figura 5, e). Para contrastar las observaciones realizadas por inmunofluorescencia, analizamos los niveles de  $\gamma$ H2AX, Smc1 y otros sustratos de ATR como Rad17 mediante WB, obteniendo equivalentes resultados (figura 5, f). En este punto pudimos concluir que la traslocación de la proteína quimérica TAD<sup>ER</sup> por la adición de 4OHT induce la fosforilación de sustratos de la respuesta al daño en el ADN.

<sup>1</sup> Utilizamos el acrónimo RS derivado del inglés en sustitución de ER (estrés replicativo) para no crear confusión con ER de Estrogen Receptor



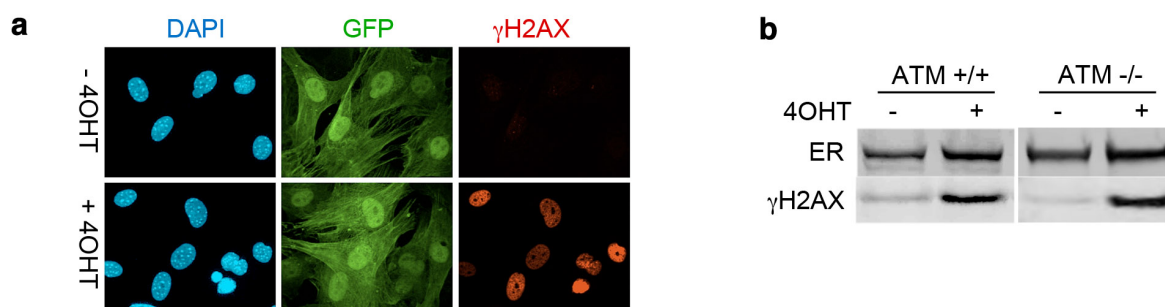


**Figura 5 | Fosforilación de sustratos de ATR inducible por 4OHT.** **a**, La adición de 4-OHT provoca una fosforilación masiva de H2AX en MEF infectados con pMXPIE-TAD<sup>ER</sup>. **b**, Análisis de HTM que muestra los niveles de  $\gamma$ H2AX por núcleo, comprobándose que la fosforilación en respuesta a 4-OHT ocurre en todas las células y proporcionalmente a los niveles de GFP. En MEF no infectados no se detecto ningún cambio. **c**,  $\gamma$ H2AX no es detectable hasta pasados los 30 minutos desde la adición de 4OHT, coincidiendo con la traslocación de TAD<sup>ER</sup>. **d**, A diferencia de la distribución en focos resultante de usar IR, el patrón de  $\gamma$ H2AX inducido por TAD<sup>ER</sup> es pan-nuclear, indicando que ATR se activa de forma deslocalizada. **e**, La fosforilación de otros sustratos como Smc1 también se da de forma pan-nuclear. **f**, Confirmación por WB de las fosforilaciones inducidas por 4-OHT. IR (10Gy) y HU (2mM, 2 horas) sirven como tratamientos control de activación de la DDR. En MEF no infectados la adición de 4OHT es inerte para la DDR.



## 2.2. La quimera TAD<sup>ER</sup> activa específicamente a ATR en respuesta a 4OHT

Dada la activa cooperación entre las quinasas ATM y ATR en fosforilar substratos comunes en respuesta a distintos tipos de daño genómico, consideramos necesario estudiar la posibilidad de que ATM pudiera estar contribuyendo en la señalización observada. Abordamos esta cuestión por dos vías complementarias. En primer lugar infectamos MEF deficientes para ATM con el retrovirus de TAD<sup>ER</sup>, en los que de nuevo observamos un aumento en los niveles de  $\gamma$ H2AX tras tratar con 4OHT, tanto por inmunofluorescencia como por WB (figura 6).

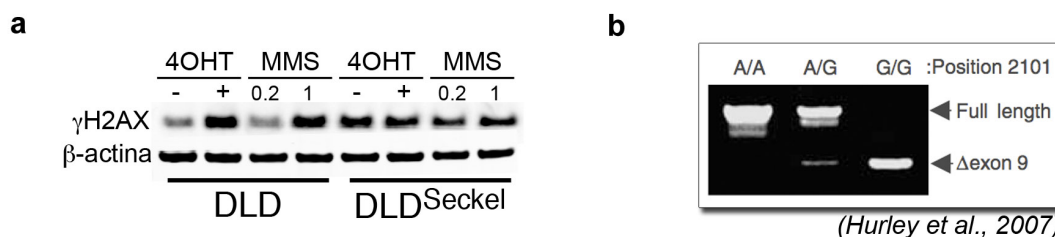


**Figura 6 | La fosforilación inducible por 4OHT es independiente de ATM.** **a**, Inmunofluorescencia que muestra la inducción del sistema TAD<sup>ER</sup> en MEF ATM <sup>-/-</sup> **b**, Mismo resultado comparado a MEF silvestres obtenido por WB, demostrando que la fosforilación de H2AX observada en MEF es independiente de ATM.

Una vez descartada la participación de ATM, comprobamos que la fosforilación en respuesta a TAD<sup>ER</sup> era dependiente de ATR. Para ello infectamos con el retrovirus de TAD<sup>ER</sup> una línea (humana) hipomorfa para ATR, en la que se ha reproducido la mutación del síndrome de Seckel mediante recombinación homóloga (Hurley et al., 2007).

Mientras que en la línea original no modificada (DLD1) TAD<sup>ER</sup> indujo la fosforilación de H2AX, no observamos variación de los niveles en la línea hipomorfa (DLD-Seckel) tras la adición de 4OHT. Teniendo en cuenta que ambas líneas únicamente difieren en la modificación genética introducida en el gen de ATR (Hurley et al., 2007), pudimos concluir que la actividad observada en respuesta a la acción de TAD<sup>ER</sup> es dependiente de ATR.

Así pudimos concluir que la proteína quimérica TAD<sup>ER</sup> estimula específicamente la actividad de ATR en células tanto humanas como murinas.

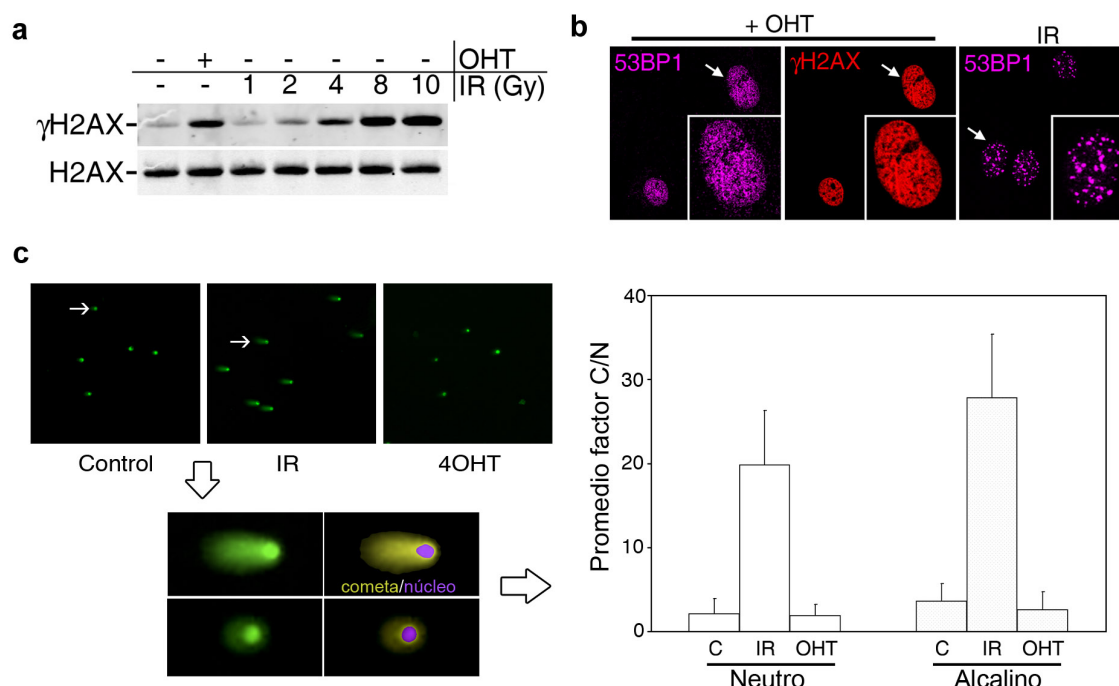


**Figura 7 | La fosforilación inducible por 4OHT es dependiente de ATR.** **a**, Análisis de la fosforilación de H2AX inducida por TAD<sup>ER</sup> en células DLD y DLD-Seckel, una línea hipomorfa para ATR. Como ya se había descrito (Hurley et al., 2007; Wilsker and Bunz, 2007), esta línea es defectiva para señalización dependiente de ATR en respuesta a agentes que provocan estrés replicativo como MMS (metilmetano-sulfonato). **b**, Adaptado de Hurley et al., 2007. RT-PCR (exon 8 - exon 10) que muestra el efecto de la mutación A/G en el splicing de ATR, generando mayoritariamente una proteína no funcional ( $\Delta$ exon 9).

### 2.3. La activación de ATR se produce en ausencia de daño en el ADN

A pesar de no haber utilizado agentes genotóxicos en nuestros ensayos, existía la posibilidad formal de que la señal que estábamos observando fuera resultado de que la expresión de TAD<sup>ER</sup> generara daño en el ADN. Teóricamente, el hecho de que el dominio de activación de TopBP1 es capaz de estimular alostéricamente al complejo ATR/ATRIP en ensayos *in vitro* hacía improbable que estuviese generando daño. Sin embargo, al estar trabajando en un sistema vivo, no se podía descartar que la expresión del transgén TAD<sup>ER</sup> tuviera efectos colaterales inesperados en el metabolismo nuclear. La cantidad de  $\gamma$ H2AX obtenida por inducción de TAD<sup>ER</sup> en 1 hora en MEF se correspondía con una dosis de irradiación aproximadamente entre 4 y 8 Gy, equivalentes a generar entre 100 y 250 DSB (Rothkamm and Lobrich, 2003) (figura 8, a) Para descartar la posibilidad de que se estuvieran provocando rupturas analizamos la formación de focos de otras proteínas implicadas en la respuesta a DSB, como 53BP1. 53BP1 es reclutada a las rupturas, a diferencia de  $\gamma$ H2AX que es fosforilada, de forma que su distribución nuclear cambia radicalmente en células con DSB. Al tratar con 4OHT MEF infectados con TAD<sup>ER</sup>, no observamos reclutamiento en focos de 53BP1 en células con altos niveles de  $\gamma$ H2AX (figura 8, b). Por el contrario los focos de 53BP1 eran claramente visibles en MEF irradiados con una dosis de 5Gy, equivalente al nivel de  $\gamma$ H2AX generado por acción de TAD<sup>ER</sup>. Para corroborar este resultado y descartar cualquier aspecto artefactual de la tinción de focos, utilizamos una técnica que detecta físicamente la aparición rupturas, como es el ensayo de cometa. Este método permite visualizar el nivel de fragmentación del ADN tanto en DSB como SSB (rupturas de cadena sencilla) de células individuales, pudiéndose cuantificar midiendo la proporción de ADN en el “cometa”. Se compararon MEF infectados sin tratar, tratados con 4OHT e irradiados con 5Gy. Mientras que el nivel de fragmentación del ADN se cuantificó fácilmente en los MEF irradiados, fue casi indetectable tanto en MEF sin tratar como en MEF

tratados con 4OHT (figura 8, c). Estas observaciones nos permitieron concluir que la activación de la señal de daño por TAD<sup>ER</sup> no está asociada a la generación de rupturas en el ADN.

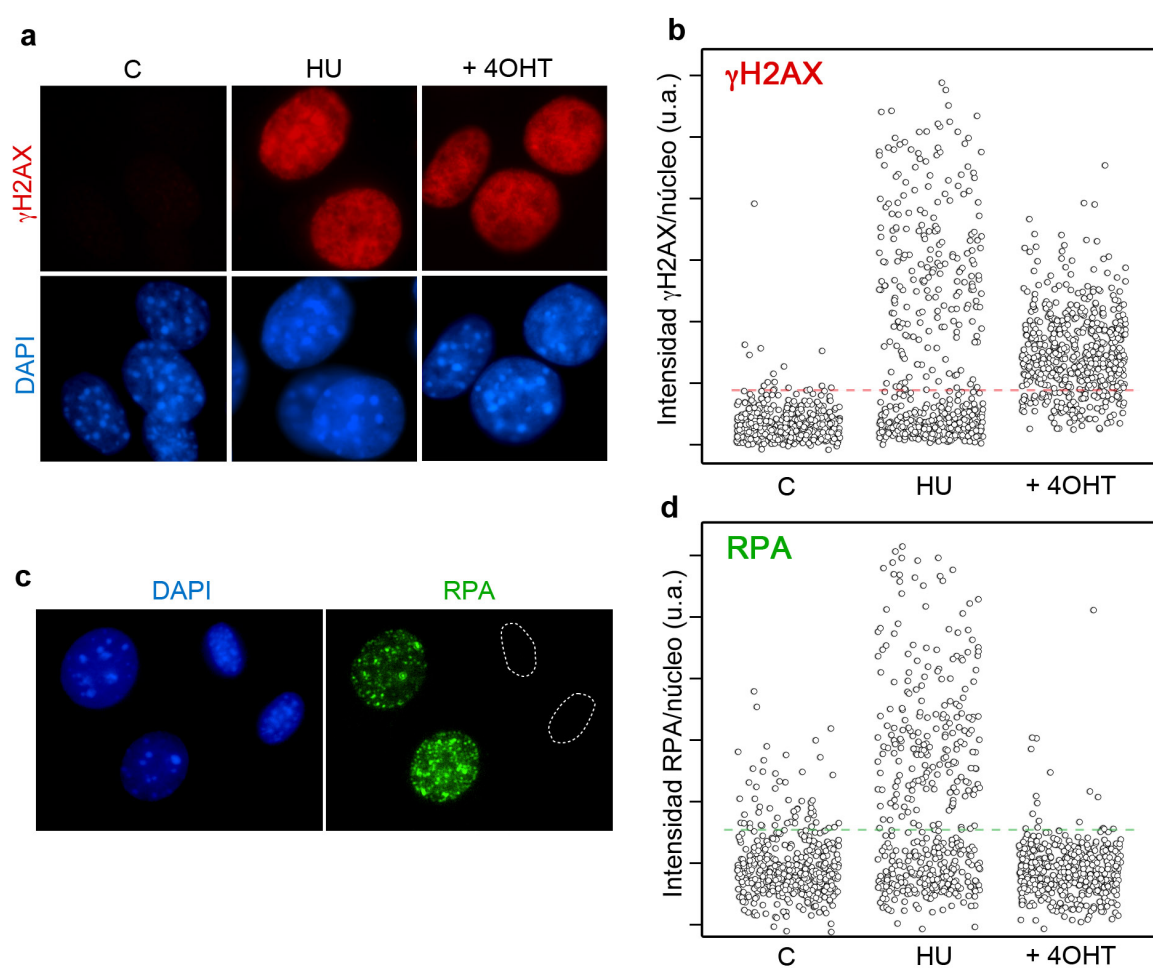


**Figura 8 | Activación de ATR en ausencia de rupturas.** **a**, Comparación de niveles de γH2AX inducidos por TAD<sup>ER</sup> y diferentes dosis de IR en MEF. **b**, Detalle del patrón de distribución de γH2AX y 53BP1 en MEF tras la activación de ATR, contrastado con aquel después de irradiar (5 Gy, 30 minutos). **c**, Ensayo de cometa. Cuando existen rupturas, el ADN escapa del núcleo si se establece una corriente eléctrica; después es visualizado mediante tinción con Sybr-green. Un software de análisis permite cuantificar la proporción de ADN en el cometa, valor indicativo del número de rupturas de cadena doble y simple (el ensayo neutro detecta DSB, mientras que el alcalino tanto DSB como SSB)

Por otra parte, ya que ATR es activada por estrés replicativo (RS), la cascada de señalización observada con TAD<sup>ER</sup> podría estar originada por la aparición de ssDNA como resultado de perturbar la replicación. De hecho, TopBP1 es fundamental para la actividad de ATR durante la síntesis de ADN (Makiniemi et al., 2001), con lo que en teoría cabría especular que la interacción de TAD<sup>ER</sup> podría estar alterando la normal actividad de las horquillas, generando RS (Ward and Chen, 2001). Además, el patrón difuso de fosforilación observado para γH2AX es similar al resultante de someter a las células a un alto nivel de RS, como por el tratamiento con hidroximetilurea (HU), que bloquea la DNA polimerasa (Nyholm et al., 1993) y genera la aparición de ssDNA (Stewart and Catchpoole, 1990) (figura 9, a). No obstante, la HU o cualquier otro agente dañino dependiente de replicación sólo provoca RS en células en fase S. Mediante HTM analizamos los niveles de γH2AX comparando la distribución en MEF infectados tratados con HU o con 4OHT durante 1 hora. Mientras que la HU indujo selectivamente la fosforilación de H2AX en sólo un 20% de las células (porcentaje que se

## Resultados

corresponde con una fase S típica en MEF), con 4OHT el 100% de las células sufrió un aumento en los niveles de  $\gamma$ H2AX, sugiriendo que no se trataba de un fenómeno dependiente de replicación (figura 9, b). Para probar finalmente la ausencia de estrés en respuesta a TAD<sup>ER</sup>, analizamos la presencia de focos de RPA marcando los segmentos de ssDNA (Manthey et al., 2007). En células replicando sin estrés, RPA no se localiza en focos y puede ser preextraída de la cromatina, de forma que podemos medir la presencia de ssDNA tanto por su redistribución como por sus niveles totales en el núcleo tras preextraer (figura 9, c). Mediante HTM observamos como de nuevo un 20% de los MEF tratados con HU tenían una mayor intensidad de RPA, resultado de la redistribución en focos discretos (figura 9, d). Por el contrario, la adición de 4OHT en MEF infectados con TAD<sup>ER</sup> no produjo un aumento en el número de células con focos de RPA.



**Figura 9 | La inducción de TAD<sup>ER</sup> no genera estrés replicativo.** **a**, Distribución pan-nuclear de  $\gamma$ H2AX en MEF tratados con HU y 4-OHT **b**, Análisis por HTM de la intensidad de  $\gamma$ H2AX en núcleos de células asincrónicas. La línea discontinua marca el nivel basal de fluorescencia en células control. Sólo un 20% de las células tratadas con HU (2mM, 1h) sufre un aumento distintivo de los niveles de  $\gamma$ H2AX. **c**, Imagen de focos de RPA en células tratadas con HU debido al estrés replicativo (2mM 1h). Los contornos punteados marcan núcleos que no estaban replicando en el momento del tratamiento. El protocolo de preextracción elimina RPA no unido a la cromatina, pudiéndose diferenciar fácilmente los núcleos con focos por la intensidad total de RPA. **d**, Análisis para RPA análogo al apartado b. Las células por encima de la línea punteada tienen estrés replicativo.

Por lo tanto, finalmente pudimos concluir que la activación de la señal de daño mediada por ATR en respuesta a TAD<sup>ER</sup> se produce en ausencia de rupturas o estrés replicativo en el ADN, y en definitiva, en ausencia de daño.

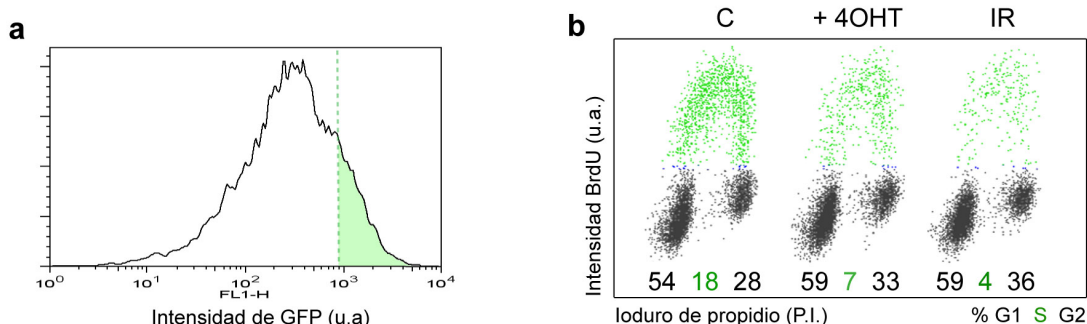
## 2.4. La activación de ATR es capaz de inducir checkpoint en MEF

Una de las consecuencias de la activación de las quinasas ATM y ATR es el establecimiento de los checkpoints de la respuesta al daño y la parada transitoria de la proliferación celular (Abraham, 2001). Nos preguntamos entonces si la cascada de fosforilaciones observada al estimular ATR mediante TAD<sup>ER</sup> era suficiente para afectar el progreso del ciclo celular. Al no provocar daño en las células para activar la capacidad catalítica de ATR, estábamos desacoplando la vía quinasas del resto de señales que en condiciones normales son activadas por el daño genómico. De esta forma podíamos comprobar si la señalización generada por las quinasas de daño es la barrera fundamental para la progresión del ciclo. Para ello examinamos en primer lugar el estado de los checkpoints en MEF infectados con TAD<sup>ER</sup>. Los datos de HTM recogidos en la figura 9 (b) confirmaban que la fosforilación de H2AX por acción de TAD<sup>ER</sup> se estaba dando en todas las células, sugiriendo la posibilidad de que la actividad de ATR en respuesta a TAD<sup>ER</sup>, a diferencia de en condiciones normales, no estuviera restringida a las fases S y G2 del ciclo. Por esta razón nos pareció interesante examinar si era posible inducir un checkpoint en G1 con nuestro sistema. Para ello se infectaron MEF primarios, se seleccionaron con puromicina y se analizó la incorporación de BrdU como medida de activación del checkpoint G1/S. En nuestros primeros ensayos no observamos una disminución significativa de la población positiva para BrdU en respuesta a 4OHT, mientras que ésta fue evidente usando radiación ionizante, que activa el checkpoint a través de ATM (datos no mostrados). A pesar de que estos resultados estaban en consonancia con la separación funcional de ambas quinasas, consideramos la posibilidad de que fuese necesario un mayor nivel de activación de ATR por TAD<sup>ER</sup> para activar el checkpoint. Dada la correlación observada en los niveles de  $\gamma$ H2AX y TAD<sup>ER</sup> en respuesta a 4OHT (figura 5, b), establecimos la hipótesis de que sólo en aquellas células con una mayor expresión de TAD<sup>ER</sup> se alcanzaría la señal necesaria para desencadenar el checkpoint. Así, esta señal estaría siendo enmascarada por una mayoría de la población con niveles insuficientes. Para validar esta opción, aislamos el 10% de células con mayores niveles de GFP (proporcionales a los de TAD<sup>ER</sup>) con un separador celular FACSCanto (figura 10, a). Una vez aislada esta población pudimos detectar claramente una activación del checkpoint G1/S en respuesta a 4OHT semejante a la observada con una dosis de 5Gy (figura 10, b). En estas mismas muestras detectamos una acumulación de células en la fase G2 del ciclo



## Resultados

comparables a las irradiadas, lo que demostraba que la señal originada por ATR también estaba desencadenando la activación del checkpoint premitótico G2/M. Por lo tanto concluimos que el sistema TADER es capaz de inducir los checkpoints G1/S y en G2/M en MEF cuando se expresa a altos niveles.

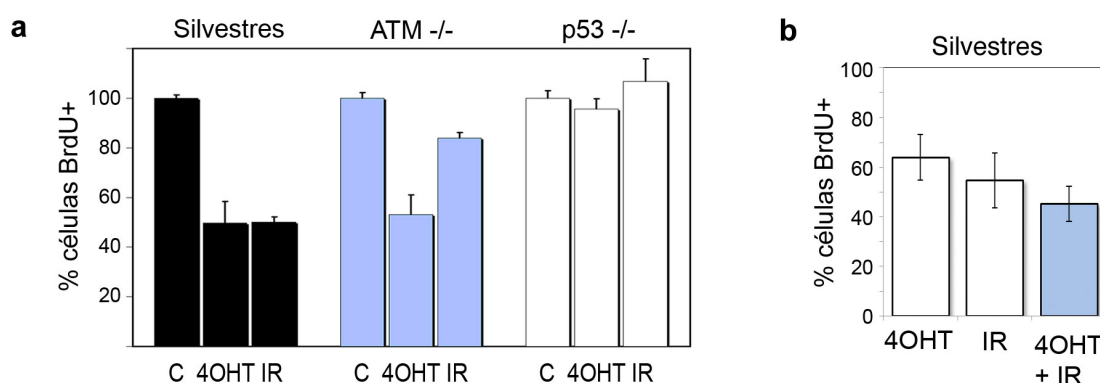


**Figura 10 | Parada del ciclo en MEF con altos niveles de TAD<sup>ER</sup>.** **a**, Población aislada de MEF infectados con pMXPIE-TAD<sup>ER</sup> (en verde) **b**, Diagrama de incorporación de BrdU, con el que se evaluó la parada del ciclo en los MEF previamente aislados, 24 horas después de tratar con 4-OHT o irradiar con 5Gy. Se indican los porcentajes de células en cada fase del ciclo, evidenciándose en ambos casos una parada en G1 y G2

## 2.5. El checkpoint G1/S inducido por ATR depende de p53 pero no de ATM

La evidencia de que el TAD estaba provocando un claro arresto en G1 iba en contra de una de las bases de la DDR, y es que las células no pueden activar ATR fuera de S y G2. En primer lugar pensamos en la posibilidad de que pudiera darse cierta reactividad del TAD con ATM. Decidimos comprobar entonces si el TAD era capaz de provocar el checkpoint en G1 en ausencia de ATM. Como se describe en la introducción, la falta de actividad de ATM es causa de un grave síndrome humano, Ataxia-Telangiectasia o A-T. Algunas de las patologías más severas de esta enfermedad, como la radiosensibilidad y la predisposición al cáncer, están asociadas a nivel celular al deficiente establecimiento de los checkpoints regulados por ATM, y, fundamentalmente, al de G1 (Shiloh, 2003a; Shiloh, 2003b). La posibilidad de que ATR sea molecularmente capaz de activar el checkpoint en G1 en ausencia de ATM, sugiere que hipotéticamente las patologías de A-T asociadas a la deficiencia de señalización podrían aliviarse activando a ATR.

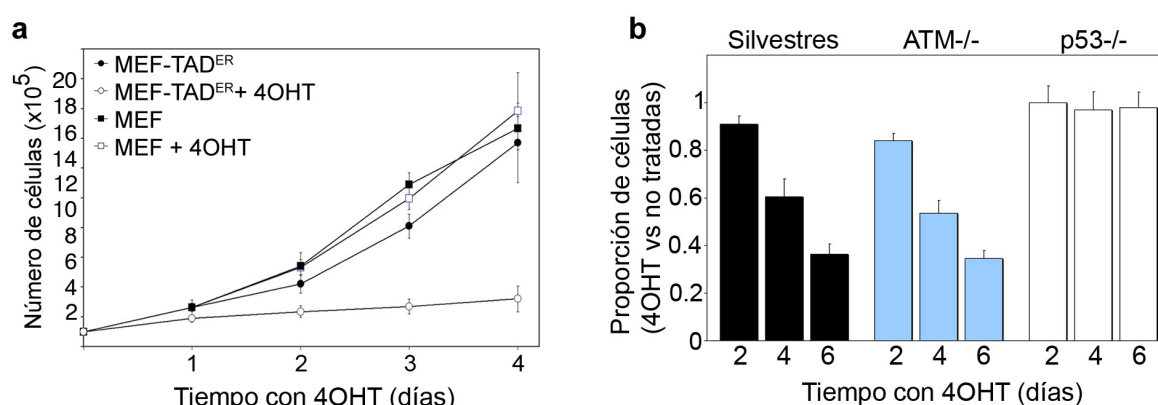
Para comprobar que ATR y no ATM era la quinasa responsable del arresto en G1 por acción de TAD<sup>ER</sup>, se infectaron en paralelo MEF silvestres y MEF deficientes en ATM con TAD<sup>ER</sup>. Como control, los MEF ATM <sup>-/-</sup> manifestaron la característica deficiencia en el checkpoint G1/S en respuesta a radiación ionizante (5Gy) en comparación con los MEF silvestres (Xu and Baltimore, 1996). Sin embargo, la adición de 4OHT provocó un arresto semejante en ambas líneas (figura 11, a). Quedaba así demostrado que la actividad quinasa de ATR es suficiente para desencadenar un checkpoint G1/S independiente de ATM. Este resultado confirmaba la primera evidencia experimental de una complementación funcional de la ausencia de ATM por ATR. De hecho, la combinación de irradiación con una dosis moderada (5Gy) y tratamiento con 4OHT en MEF silvestres produjo un efecto aditivo en los niveles de arresto, evidenciando que ambas quinasas pueden colaborar cuantitativamente en la inducción del checkpoint (figura 11, b). Para demostrar que el checkpoint inducido por ATR recapitulaba una señalización a través de la vía canónica, analizamos la dependencia del arresto observado de p53, el efector maestro del arresto en G1/S. Se obtuvieron MEF deficientes para p53 con altos niveles de TAD<sup>ER</sup> en paralelo con MEF silvestres. Como es característico en ausencia de p53, los MEF p53 <sup>-/-</sup> exhibieron una deficiencia total en la capacidad de establecer el checkpoint tras ser expuestos a radiación ionizante (5 Gy) (figura 11, a). La adición de 4OHT tampoco produjo arresto alguno, demostrando así que ATR era capaz de complementar la deficiencia de ATM señalizando a través de la vía canónica dependiente de p53. Este resultado sugiere que ambas quinasas difieren en el estímulo que las activa pero son funcionalmente equivalentes.



**Figura 11 | Arresto canónico en G1 independiente de ATM.** **a**, Incorporación de BrdU para MEF silvestres, ATM <sup>-/-</sup> y p53 <sup>-/-</sup>. El diagrama representa el porcentaje de células positivas para tinción de BrdU respecto al control tras incubación con 4OHT o irradiación con 5Gy. **b**, Incorporación de BrdU en células silvestres tratadas con 4OHT, irradiadas con 5Gy, o sometidas a ambos tratamientos.

## 2.6. El checkpoint permanente detiene la proliferación celular en MEF

La función de los checkpoints es retrasar o ralentizar el progreso en el ciclo de forma transitoria para poder asegurar que las lesiones en el ADN no sean transmitidas a las células hijas o amenacen la correcta segregación cromosómica. Cuando células en proliferación son expuestas puntualmente a dosis moderadas de agentes genotóxicos, el daño inicial genera una parada transitoria hasta que es eficientemente reparado, dando paso a la reentrada en el ciclo. Esta reentrada es mediada por un proceso activo que regula el apagado progresivo de los checkpoints. Como el sistema TAD<sup>ER</sup> nos permite inducir un checkpoint con la simple exposición a 4OHT, nos planteamos si la presencia constante de esta droga en el medio de cultivo podría activar a ATR permanentemente, resultando en un arresto continuado. Para ello se obtuvo una población policlonal de MEF con altos niveles de TAD<sup>ER</sup> y se realizaron contajes de MEF silvestres o MEF infectados en presencia o ausencia de 4OHT durante 4 días. Tanto los MEF silvestres con o sin 4OHT como los MEF infectados en ausencia de la droga siguieron un crecimiento de tipo exponencial (3-4 duplicaciones en 4 días). Sin embargo, en presencia de 4OHT la proliferación de estos MEF se detuvo substancialmente, apenas superando una duplicación en el mismo periodo de tiempo (figura 12, a). Las diferencias observadas entre MEF infectados y no infectados sin 4OHT se debieron a la pérdida de capacidad proliferativa que manifiestan los MEF primarios por el estrés generado en la intensa manipulación en cultivo (infección, selección con puromicina, aislamiento por FACS), y no a un efecto basal de TAD<sup>ER</sup>. Comprobamos por inmunofluorescencia que 4 días después la señal seguía activa, ya que se mantenían los niveles de  $\gamma$ H2AX y la localización de TAD<sup>ER</sup> era nuclear (datos no mostrados).



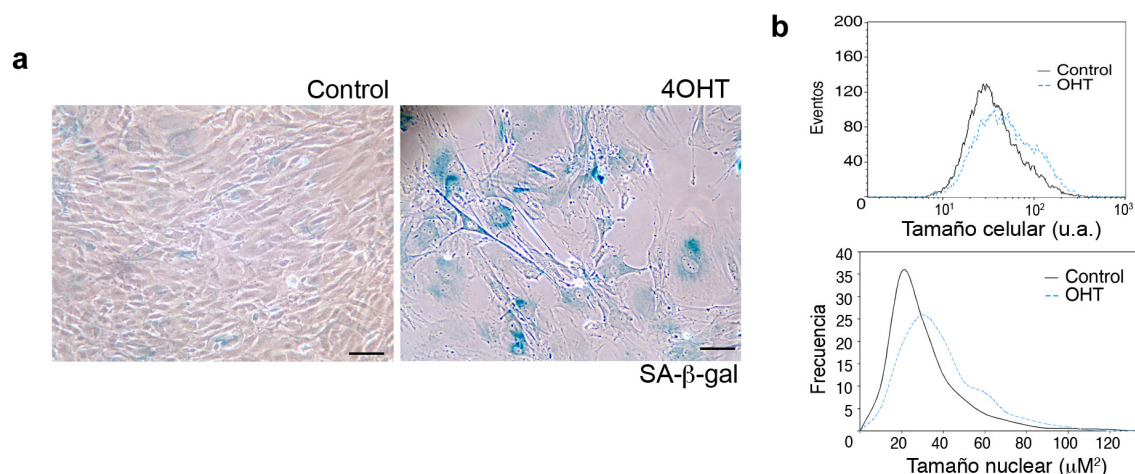
**Figura 12 | Parada proliferativo dependiente de p53.** a, Curvas de proliferación de MEF silvestres y MEF TAD<sup>ER</sup> en ausencia o presencia constante de 4OHT b, Proliferación de MEF silvestres, ATM<sup>-/-</sup> y p53<sup>-/-</sup> con TAD<sup>ER</sup> en presencia de 4OHT.



Ya que habíamos visto que la señalización del checkpoint era independiente de ATM pero no de p53, nos preguntamos si la pérdida de potencial proliferativo observada tenía los mismos requerimientos genéticos. Para ello se infectaron y aislaron MEF silvestres, deficientes en ATM, y en p53, y se realizaron contajes a distintos días en presencia o ausencia de 4OHT. De nuevo, mientras que los MEF ATM  $-/-$  se comportaron igual que los silvestres, la falta de p53 inhabilitó la capacidad del sistema de detener el crecimiento celular (figura 12, b). Pudimos concluir entonces que la activación permanente de ATR se traduce en una parada de la proliferación con las mismas dependencias genéticas observadas en la inducción de los checkpoints por daño en el ADN.

## **2.7. La actividad persistente de ATR provoca la entrada en senescencia.**

La explicación más simple para nuestras observaciones podía ser que, si bien la función de un checkpoint es el arresto transitorio de la progresión del ciclo, la presencia constante de 4OHT en el medio generara un arresto transitorio “permanente” en la proliferación. La alternativa era, sin embargo, que la señalización persistente mediada por ATR fuera capaz de iniciar en las células un programa genético prematuro de arresto irreversible o senescencia. La entrada temprana en senescencia se puede observar en MEF tras la sobreexpresión de oncogenes como RasV12, fenómeno mediado por p53 (Serrano et al., 1997). Datos recientes sugieren que la activación de RasV12 y otros oncogenes genera estrés en las horquillas de replicación, dando lugar a una respuesta al daño persistente que es capaz de llevar a las células a senescencia (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Dado el papel crucial de ATR en la transducción del estrés durante la replicación, nos preguntamos si la activación constante inducida por TAD<sup>ER</sup> podría estar mimetizando la respuesta a oncogenes y no sólo generando un “checkpoint permanente”, sino activando el programa de senescencia. Para ello, tras 4 días con 4OHT analizamos la morfología de los MEF arrestados, y en efecto manifestaban un fenotipo senescente. Para confirmar la entrada prematura en senescencia de estas células realizamos una tinción de actividad  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 con X-gal, específica de células senescentes (Dimri et al., 1995). Efectivamente, los MEF expuestos a la actividad de ATR durante 96 horas poseían, además de la morfología característica, una clara actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de células senescentes (figura 13, a).



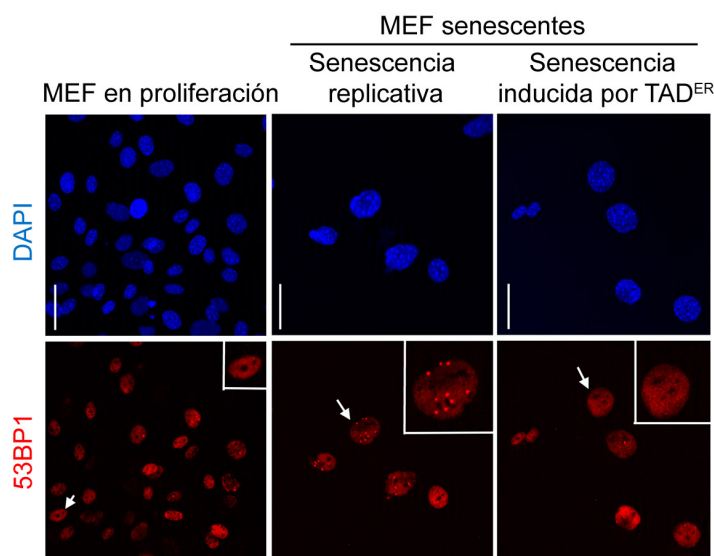
**Figura 13 | Senescencia inducida por la actividad persistente de ATR.** **a**, Imagen de MEF TAD<sup>ER</sup> tras 96 horas de tratamiento con 4OHT. La coloración azul se debe a la actividad β-galactosidasa a pH 6 revelada por X-gal. **b**, Histogramas representativos del aumento generalizado en el tamaño celular y el área nuclear, examinados por FACS y HTM respectivamente.

Además, mediante análisis por citómetro y HTM pudimos detectar un aumento generalizado del tamaño nuclear y celular (figura 13, b). Concluimos así que el arresto persistente generado por la señalización de ATR lleva a la entrada prematura en senescencia.

## 2.8. ATR induce senescencia no asociada a daño en el ADN

Morfológicamente, no fuimos capaces de diferenciar esta senescencia prematura de la inducida clásicamente por pases secuenciales en cultivo. La senescencia inducida en cultivo se debe al estrés oxidativo provocado por la alta concentración de oxígeno atmosférico, lo que genera constantemente daño en el ADN (Di Micco et al., 2008; Parrinello et al., 2003). Así, en células ya senescentes la acumulación de daño no reparado es visible en forma de focos de reparación de diferentes factores (Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007; Sedelnikova et al., 2004). A diferencia de estos casos, quisimos comprobar que incluso el arresto mediado por ATR estaba exento de generación de daño en el ADN. Para ello infectamos y seleccionamos MEF primarios e indujimos la entrada en senescencia mediante la exposición continuada 4OHT (en baja concentración de oxígeno) o por pases de cultivo (9 a 10 pases en alta concentración de oxígeno). Teñimos para un marcador común de DSB como es 53BP1, y de acuerdo con los resultados que ya habíamos obtenido, apenas observamos focos en los MEF en senescencia

mediada por ATR (figura 14), a diferencia de lo que se observa en la senescencia mediada por estrés replicativo. Por lo tanto, la senescencia observada por activación persistente de ATR ocurre sin la aparición de daño en el ADN.



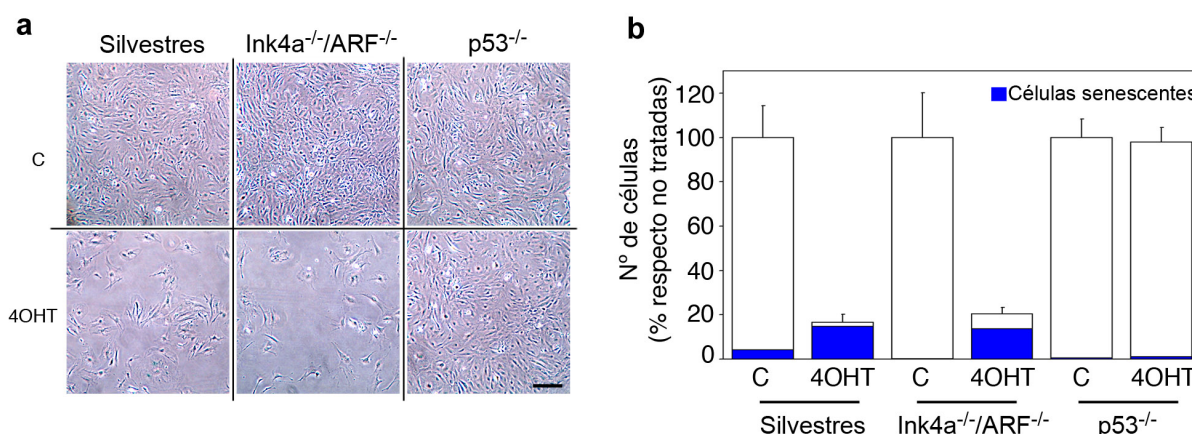
**Figura 14 | La senescencia inducida por TADER no esta asociada a daño replicativo.** Inmunofluorescencia para 53BP1 de MEF en proliferación y MEF llevados a senescencia. Los MEF senescentes por pases de cultivo presentan focos de daño acumulado por estrés replicativo, mientras que no se observan focos en aquellos en los que se indujo senescencia por activación persistente de ATR. Obsérvese el mayor tamaño del núcleo en las células senescentes (ambos casos).

## 2.9. La senescencia inducida por ATR es dependiente de p53, pero no de p19<sup>ARF</sup>

Los MEF ATM<sup>-/-</sup> en parada permanente manifestaron la misma morfología senescente. Además, aunque ATR estuviera generando una señal persistente semejante a la provocada por oncogenes, la ausencia de arresto en los MEF p53<sup>-/-</sup> concordaba con otras evidencias experimentales (Serrano et al., 1997). Por otro lado existen evidencias de que además de la respuesta al daño, p19<sup>ARF</sup> es fundamental para la senescencia inducida por oncogenes dependiente de p53 (Palmero et al., 1998). ATM/ATR y p19<sup>ARF</sup> regulan p53 por vías separadas y en respuesta a diferentes estímulos (Kamijo et al., 1997; Stott et al., 1998). De hecho, recientes trabajos afirman que la supresión tumoral ejercida por p53 *in vivo* es mediada enteramente por p19<sup>ARF</sup> (Efeyan et al., 2006), y no por la respuesta al daño en el ADN (Christophorou et al., 2006; Kamijo et al., 1997). Nos planteamos entonces analizar si ATR estaba actuando independientemente sobre p53, o si en el fondo la persistencia de la señal estaba siendo

## Resultados

transmitida a p53 por p19<sup>ARF</sup>. Infectamos con TAD<sup>ER</sup> MEF silvestres, p53<sup>-/-</sup> e Ink4a<sup>-/-</sup>-ARF<sup>-/-</sup> en paralelo y los tratamos con 4OHT en cultivo durante 4 días. Como ya se había observado, los MEF Ink4a<sup>-/-</sup>-ARF<sup>-/-</sup> se comportaron como células inmortales en cultivo, no manifestando ningún arresto asociado al estrés (Kamijo et al., 1997). Sin embargo, a diferencia de los p53<sup>-/-</sup>, la activación prolongada de ATR fue capaz de detener la proliferación de los MEF deficientes en p19<sup>ARF</sup> de forma similar a los silvestres y de inducir la entrada en senescencia (figura 15, a y b). Pudimos concluir entonces que la activación constante de ATR es capaz de inducir senescencia prematura a través de p53 de forma independiente de p19<sup>ARF</sup>.



**Figura 15 | La senescencia inducida por ATR es independiente de Ink4a/ARF.** a, Panel en el que se muestran MEF silvestres, Ink4a<sup>-/-</sup>-ARF<sup>-/-</sup> y p53<sup>-/-</sup> no tratados y tratados con 4OHT durante 96 horas. b, Cuantificación de células senescentes por tinción de SA-β-gal.

## 3. Expresión del sistema en líneas inmortales

Nuestros resultados en MEF primarios aportaban evidencias fisiológicas de que la respuesta al daño en el ADN tiene la capacidad de inducir senescencia a través de p53, sugiriendo que podría ser una barrera potencial en la transformación tumoral.

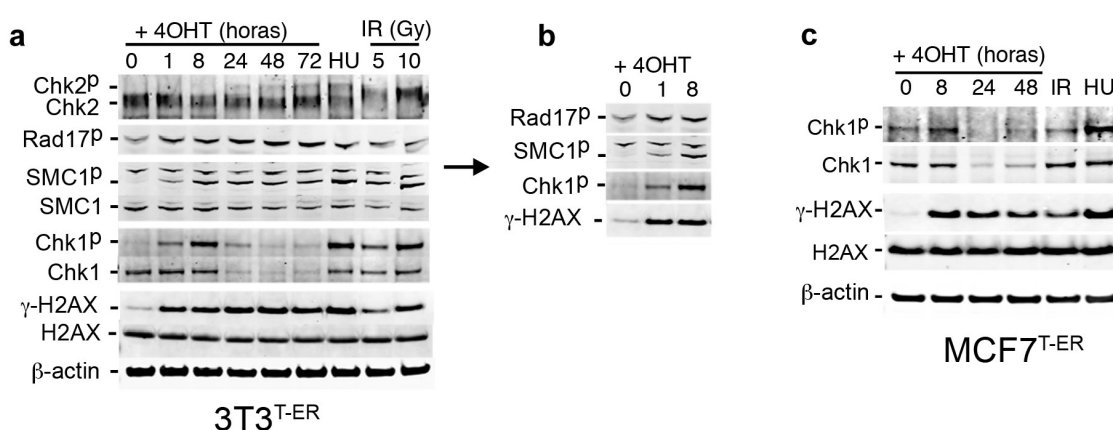
No obstante consideramos necesario trasladar el sistema de activación de ATR a líneas inmortales por dos razones fundamentales. La principal, para comprobar si ATR también podía actuar como supresor tumoral induciendo la senescencia en líneas cancerosas o transformadas. La segunda razón era que con el establecimiento de líneas estables evitaríamos los problemas implícitos de generar infecciones policlonales en MEF, en las que la principal limitación era la variabilidad y heterogeneidad de los niveles de expresión de TAD<sup>ER</sup>. Así tendríamos de líneas celulares donde generar una señal estable y reproducible, con la que

estudiar en detalle tanto los mecanismos implicados como los efectos moleculares de la activación de ATR.

Desarrollamos clones estables en fibroblastos murinos NIH3T3 y en células humanas de cáncer de mama MCF-7 (designados 3T3<sup>T-ER</sup> y MCF7<sup>T-ER</sup> respectivamente; ver materiales y métodos). De acuerdo con nuestras observaciones en MEF (figura 5b, figura 10) estos clones se escogieron por su alta expresión de GFP para disponer de unos niveles óptimos de TAD<sup>ER</sup> y actividad de ATR.

### 3.1. ATR fosforila múltiples substratos en líneas inmortales

Comenzamos probando la funcionalidad del sistema en 3T3<sup>T-ER</sup> y MCF7<sup>T-ER</sup>, analizando por WB la fosforilación de substratos de ATR a diferentes tiempos de incubación con 4OHT. En ambos clones detectamos una robusta y constante activación de ATR, claramente visible por los niveles de  $\gamma$ H2AX (figura 16, a,b,c). Realizamos ensayos de cometa en ambas líneas para constatar que la señal no estaba siendo generada por daño genómico (datos no mostrados). De nuevo, como ya vimos en MEF, la estimulación de TAD<sup>ER</sup> era suficiente para provocar la fosforilación de Rad17 y Smc1 en 3T3<sup>T-ER</sup>. Además, en ambos clones detectamos una rápida fosforilación de Chk1 (serina 345) tras la adición de 4OHT, hecho que ratificaba una vez más la capacidad del sistema TAD<sup>ER</sup> para recapitular una íntegra activación de ATR. Por el contrario, como una prueba más de la ausencia de activación de ATM, no pudimos observar fosforilación de Chk2, claramente visible en cambio en respuesta a radiación ionizante (figura 16, a).



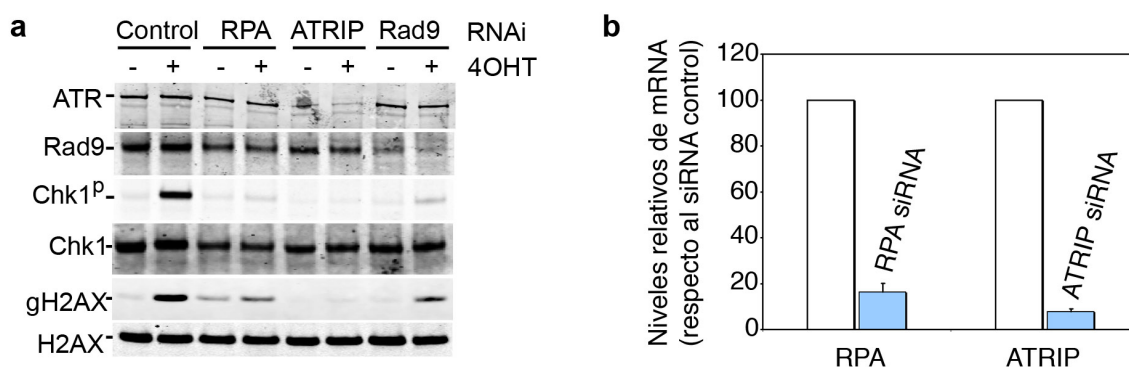
**Figura 16 | Fosforilación de substratos de ATR en líneas inmortales.** **a**, WB que muestra la fosforilación de substratos de ATR en respuesta a la inducción de TAD<sup>ER</sup> en el clon 3T3<sup>T-ER</sup>. HU (hidroxiurea 2mM, 2h) e IR (5, 10 Gy, 1h) se utilizaron como controles de activación de la DDR. **b**, Detalle donde se aprecian únicamente las fosforilaciones en respuesta a 4OHT. **c**, Resultados análogos en MCF7<sup>T-ER</sup>.



### 3.2. La fosforilación de sustratos provocada por TAD<sup>ER</sup> necesita RPA, Rad9 y ATRIP

Puesto que la estimulación de ATR mediada por TAD<sup>ER</sup> era en un fenómeno completamente independiente de la actividad endógena de la proteína, quisimos examinar si había otros miembros de la ruta que fueran determinantes para su actividad. De hecho, dado que el único requerimiento para que el TAD active el complejo *in vitro* era ATRIP (Kumagai et al., 2006), partíamos de la idea de que en el contexto celular otros reguladores de la actividad de ATR en respuesta a ssDNA serían irrelevantes. Para ello redujimos en 3T3<sup>T-ER</sup> la expresión de ATRIP, Rad9 y RPA con shRNA específicos, y analizamos la fosforilación de H2AX (serina 139) y Chk1 (serina 345) como marcadores canónicos de la activación de ATR en respuesta a 4OHT.

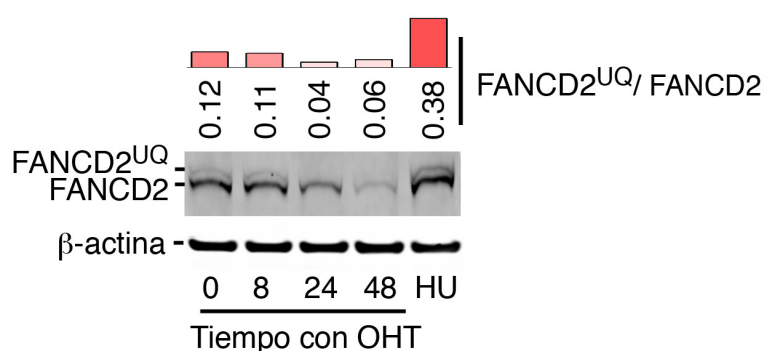
Consistente con la especificidad del TAD por ATR, la bajada de los niveles de ATRIP provocó la casi completa eliminación de ATR y la total desaparición de la fosforilación de H2AX y Chk1 (figura 17, a). Sorprendentemente, la disminución de RPA y Rad9 comprometieron también seriamente la capacidad del sistema. Estos resultados pueden responder a varias interpretaciones, que se debaten ampliamente en la discusión, aunque en cualquier caso ponían de manifiesto que incluso la activación artificial inducida por TAD<sup>ER</sup> requiere de otros componentes de la ruta de ATR para fosforilar sustratos clave como H2AX y Chk1.



**Figura 17 | Actividad de ATR mediada por TAD<sup>ER</sup> en ausencia de RPA, ATRIP y RAD9. a,** WB que muestra el efecto de eliminar RPA, ATRIP y Rad9 sobre la fosforilación de chk1 y H2AX inducida por TAD<sup>ER</sup>. Los niveles totales de Rad9 sirven como control para mostrar el efecto del siRNA. **b,** RT-PCR que muestra los niveles relativos de RNA mensajero de RPA y ATRIP en el momento del tratamiento con 4OHT.

### 3.3. La activación ectópica de ATR no es suficiente para ubiquitinar FANCD2

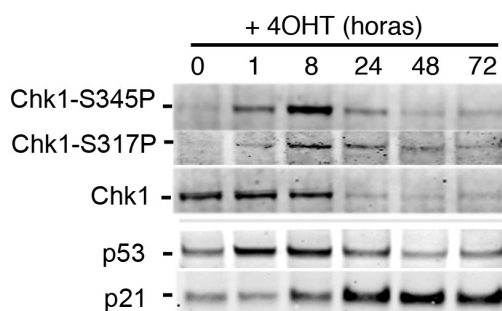
Existen otras modificaciones postraduccionales que se inducen en respuesta al daño en el ADN distintas a la fosforilación, como son la acetilación, sumoilación o ubiquitinación. Como con el sistema de TAD<sup>ER</sup> no se genera daño, podíamos estudiar si la sola activación de ATR era capaz de promover otras cascadas de señalización complementarias a la fosforilación. Uno de los eventos de señalización más conocidos no mediado por fosforilación es la ubiquitinación de FANCD2 en respuesta a diferentes agentes genotóxicos en células humanas (Andreassen et al., 2004b). Además, se ha propuesto que esta ubiquitinación es dependiente de la actividad catalítica de ATR (Ho et al., 2006). Para comprobar si la actividad quinasa de ATR era capaz de inducir la ubiquitinación de FANCD2 en ausencia de daño, analizamos la proporción de FANCD2 ubiquitinada en respuesta a 4OHT en MCF7<sup>T-ER</sup>. Las dos formas de la proteína son diferenciables mediante electroforesis por su diferente peso molecular. Mientras que el tratamiento con HU indujo un claro aumento de la ubiquitinación, no se observó ninguno tras la adición de 4OHT (figura 18). Por el contrario, como ocurre con Chk1, la banda ubiquitinada desapareció por completo a las 24 horas de tratamiento ya que la ubiquitinación de FANCD2 se da específicamente en fase S (Taniguchi et al., 2002). Por lo tanto la activación de ATR por TAD<sup>ER</sup> no es capaz de generar actividad ubiquitin-ligasa en ausencia de daño, lo que implica que otras cascadas de señalización independientes de ATR son necesarias para eventos distintos a la fosforilación. Por otra parte, el no ver ubiquitinación de FANCD2 es una confirmación más de la ausencia de daño en nuestro sistema.



**Figura 18 | La activación de ATR por TAD<sup>ER</sup> no es suficiente para ubiquitinar FANCD2.** WB en el que se diferencian las bandas correspondientes a la forma de FANCD2 monoubiquitinada de la no ubiquitinada por la diferencia en peso molecular y movilidad en electroforesis. Mientras que con HU (4h 2mM) se observa un claro incremento en la forma ubiquitinada, con 4OHT la banda incluso disminuye, al igual que los niveles totales de la proteína. Las proporciones FANCD2<sup>UQ</sup>/FANCD2 se obtuvieron por análisis digital de imagen.

### 3.4. Inducción de efectores del arresto en G1 por la actividad de ATR

El dato mas interesante del análisis fue revelar dos comportamientos moleculares completamente diferentes en respuesta a la actividad persistente de ATR. Mientras que los niveles totales y de fosforilación de H2AX, Smc1 y Rad17 se mantenían constantes, Chk1 sufría una drástica disminución tras 24 horas de incubación con 4OHT (los extractos de proteína eran totales). Ni los niveles de fosforilación en la serina 317 o en la 345 parecían reducirse sino que era la proteína total. Se sabe que el estrés persistente señalizado por ATR induce, al menos en humanos, la ubiquitinación y degradación de Chk1 fosforilado en S345 (Zhang et al., 2005). Por otro lado, puesto que la expresión de Chk1 es dependiente de ciclo (Kaneko et al., 1999), y es dirigida por E2F (Carrassa et al., 2003), su desaparición podía deberse a la inhibición de actividad CDK por la señalización constante de ATR. Para evaluar esta posibilidad exploramos la expresión de p21, el inhibidor de CDK esencial para la parada en G1, y de su inductor transcripcional p53 (figura 19). Así, observamos una perfecta correlación entre la inducción de p53/p21 en 3T3<sup>T-ER</sup> y la desaparición de Chk1, fenómeno ya registrado como consecuencia del arresto del ciclo en respuesta a daño persistente (Gottifredi et al., 2001), sugiriendo que la señalización constante de ATR estaba provocando la activación de un checkpoint G1/S canónico (figura 19).

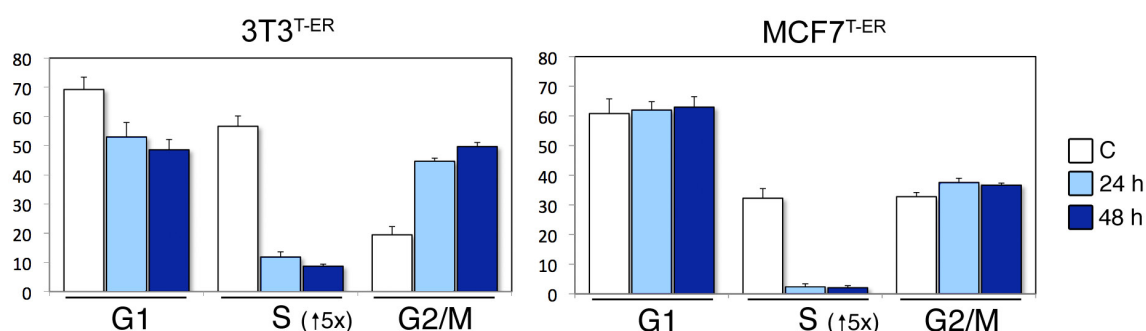


**Figura 19 | Activación de inductores de parada del ciclo por TAD<sup>ER</sup>** Inducción de p53 y p21 en 3T3<sup>T-ER</sup> por la activación persistente de ATR. Se observan claramente 2 ondas diferentes de actividad: la señal de la DDR induce inicialmente la fosforilación de chk1 y la estabilización de p53. La activación de p53 provoca la expresión de p21 y los niveles se mantienen incluso cuando p53 ha vuelto a los normales. La desaparición de chk1 (aun cuando permanece fosforilado) sólo es evidente cuando p21 alcanza el máximo de expresión, sugiriendo que la ausencia de actividad CDK puede ser la responsable.



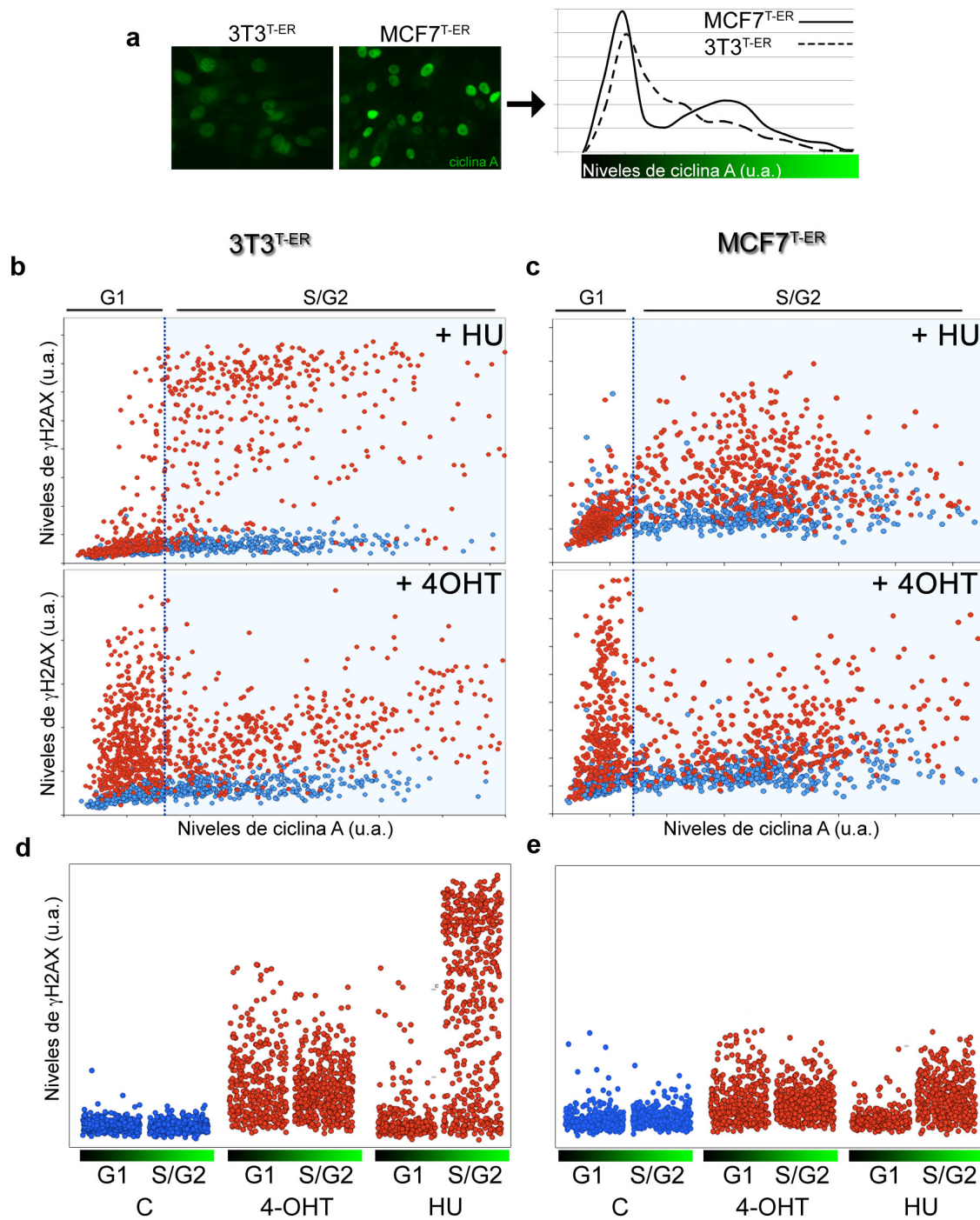
### 3.5. Inducción del checkpoint G1/S por actividad de ATR en G1

Al igual que en MEF, examinamos la incorporación de BrdU en 3T3<sup>T-ER</sup> y MCF7<sup>T-ER</sup> tras la exposición a 4OHT. De nuevo, como ya habíamos visto en células primarias, en ambas líneas se indujo un bloqueo prácticamente total del ciclo en la frontera G1/S (figura 20).



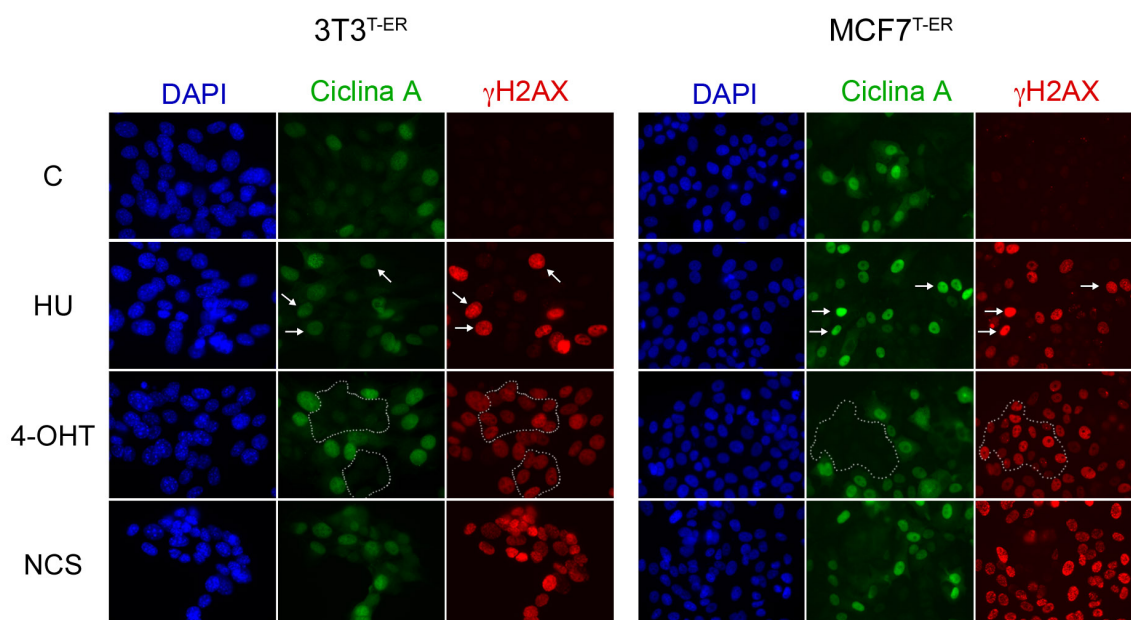
**Figura 20 | Activación de los checkpoints por TAD<sup>ER</sup>.** Tras 24 y 48 horas con 4-OHT las células se incubaron 1 hora con BrdU, y tras la tinción se midieron los porcentajes de células en G1, S y G2/M. Se representan los valores absolutos de cada fase para tres experimentos independientes. El dato de células en S está magnificado 5 veces para apreciar en detalle los valores (inicialmente 3T3 C 10,9%, MCF7 C 6,1%).

Ya al expresar el TAD en MEF preveíamos que ATR fuera activable en las fases S y G2 del ciclo, pero no esperábamos observar un arresto en G1 inducido por TAD<sup>ER</sup>. Este fenómeno podía implicar que el complejo ATR/ATRIP, aunque no se activara en situaciones fisiológicas normales en G1 (principalmente por la ausencia de resección), pudiera ser estimulado. Si bien ATR parecía en efecto activarse rápidamente en todas las células (figura 5 b), era necesario comprobar formalmente si tenía actividad quinasa en G1. Para ello analizamos en detalle el patrón de fosforilación de H2AX en 3T3<sup>T-ER</sup> y MCF7<sup>T-ER</sup> asincrónicas tras 1 hora de inducción con 4OHT, combinándolo con el de un marcador específico de fases S y G2, como la ciclina A. Esta ciclina comienza a expresarse en fase S temprana, llegando a un máximo en la entrada en G2. Tras la tinción obtuvimos un patrón de intensidades de ciclina A heterogéneo, que a simple vista podía deberse a las diferentes fases del ciclo (figura 21, a). Mediante HTM tomamos lecturas de un alto número de células y distribuimos las intensidades en un histograma, observando que correlacionaban con una típica curva de ciclo.



**Figura 21 | Activación de ATR por TAD<sup>ER</sup> independientemente de la fase del ciclo, a**, Histograma resultante de los valores de intensidad de ciclina A por inmunofluorescencia de células asincrónicas, que se asemeja a una distribución típica de contenido de ADN. **b**, Representación de los valores de intensidad de γH2AX por núcleo frente a los de ciclina A en células 3T3<sup>T-ER</sup> tratadas con 4-OHT (1h) o HU (2h, 2mM). La línea punteada divide el gráfico entre células en G1 y en S/G2 en función de la fosforilación de H2AX causada por HU, que sólo ocurre en células replicando. **c**, Misma gráfica que b para MCF7<sup>TER</sup> **d**, Condensación de los valores representados en c en 2 categorías, que permite comparar visualmente los valores de γH2AX en G1 frente a S/G2. **e**, Misma gráfica que d para MCF7<sup>TER</sup>

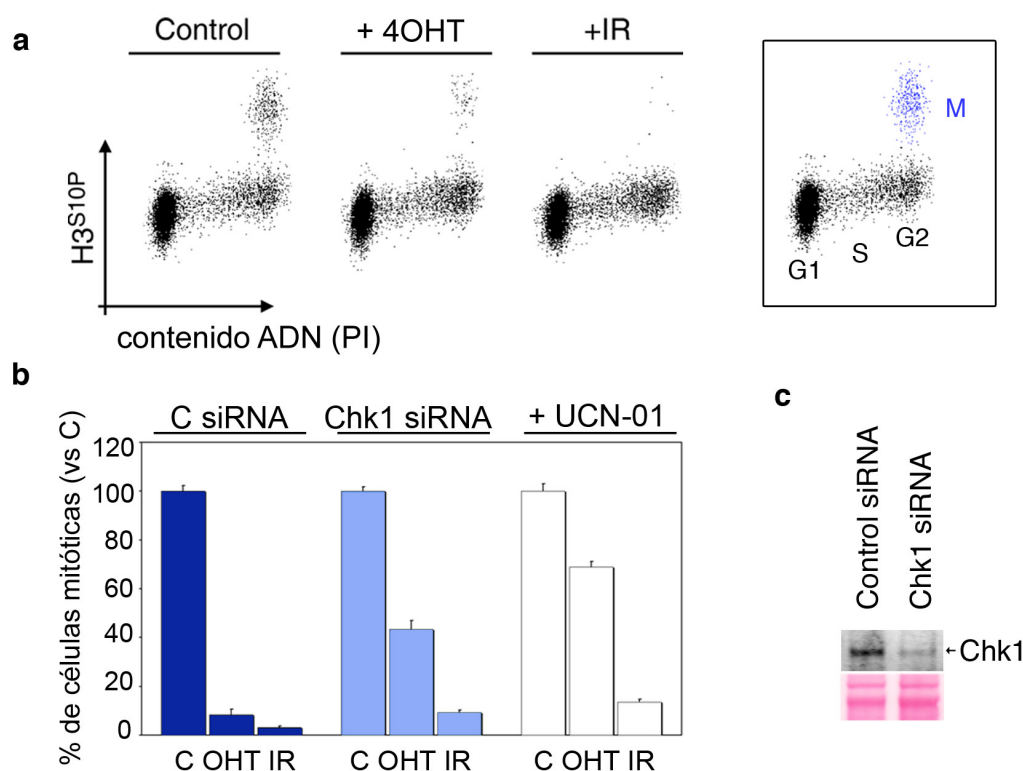
En ambas líneas se diferenciaban claramente una población con niveles basales de ciclina A y otra con valores crecientes, que podrían tratarse de las fases G1 y S/G2 respectivamente. Para determinar exactamente qué niveles de ciclina A correspondían a G1 y a S/G2, tratamos las células con HU. Ya que con HU sólo se produce estrés durante la replicación, las células en G1 estarían exentas de estrés y por lo tanto de  $\gamma$ H2AX (figura 21, b y c). Por otro lado, la fosforilación de H2AX fue generalizada al provocar DSB con un radiomimético (Neocarzinostatina o NCS). Se puede observar una muestra de imágenes en la figura 22. Una vez establecidos estos controles, observamos que tras la adición de 4OHT ATR fosforilaba H2AX independientemente de los niveles de ciclina A. Por lo tanto el complejo ATR/ATRIP es susceptible de ser activado catalíticamente en G1 si se promueve la interacción con el TAD (TopBP1). Este resultado reafirma el modelo actual por el cual la activación de ATR en respuesta al daño depende únicamente de que tenga lugar el apropiado reclutamiento de factores para poder interaccionar con TopBP1. Además, comparando los valores absolutos de H2AX en células G1 frente a S/G2 comprobamos que ATR es igualmente activa en cualquier fase del ciclo, confirmando su total independencia de los elementos reguladores endógenos y corroborando la eficacia en establecer el checkpoint en G1 (figura 21, d y e). Pudimos concluir entonces que tanto en células humanas como murinas ATR puede ser activada por TAD en G1, y esta activación es suficiente para provocar un arresto en G1/S.



**Figura 22 | Activación de ATR por TAD<sup>ER</sup> independientemente de la fase del ciclo.** Imágenes representativas de las inmunofluorescencias analizadas por HTM en la figura 20. Detalle: las flechas indican células en S/G2 con H2AX fosforilada por HU y las líneas de puntos delimitan grupos de células en G1 con H2AX fosforilada por tratamiento con 4OHT. Se muestra como control la fosforilación de H2AX en todas las fases del ciclo como consecuencia de los DSB inducidos por el radiomimético NCS (Neocarcinostatina).

### 3.6. El sistema TAD<sup>ER</sup> activa un checkpoint en G2 a través de Chk1

Examinando el patrón de la parada a las 24 y 48 horas de 4OHT (figura 20) pudimos percibir que especialmente en 3T3<sup>T-ER</sup> se estaba promoviendo una clara acumulación de células tetraploides, sugiriendo que la señalización de ATR estaba también disparando el checkpoint G2/M. Para demostrar esta posibilidad, analizamos el porcentaje de células en mitosis tiñéndolas con un anticuerpo contra la forma fosforilada de la histona 3 en la serina 10, un marcador específico de condensación cromosómica (fosforilada por Aurora B). Tanto en respuesta a 4OHT como a 10Gy de radiación el porcentaje de células mitóticas se redujo ostensiblemente, evidenciando que la acumulación de células en G2 se debía a una activación del checkpoint premitótico (figura 23, a).



**Figura 23 | La activación del checkpoint en G2 por TAD<sup>ER</sup> es dependiente de Chk1.** **a**, Imágenes representativas de la tinción H3S10/PI mediante la que se identifican las células en mitosis (azul). Para obtener un mayor número de células en mitosis y tener datos más fidedignos (normalmente sólo se tiene 1 - 2% de células mitóticas), fueron tratadas con taxol (ver materiales y métodos). **b**, Gráfica en la que se representan los porcentajes relativos de células en mitosis en las condiciones indicadas. Se recogieron las células mitóticas con 8 horas de taxol. El UCN-01 se añadió las últimas 4 horas. **c**, WB que muestra los niveles de Chk1 reducidos por el siRNA en el momento de hacer el ensayo.

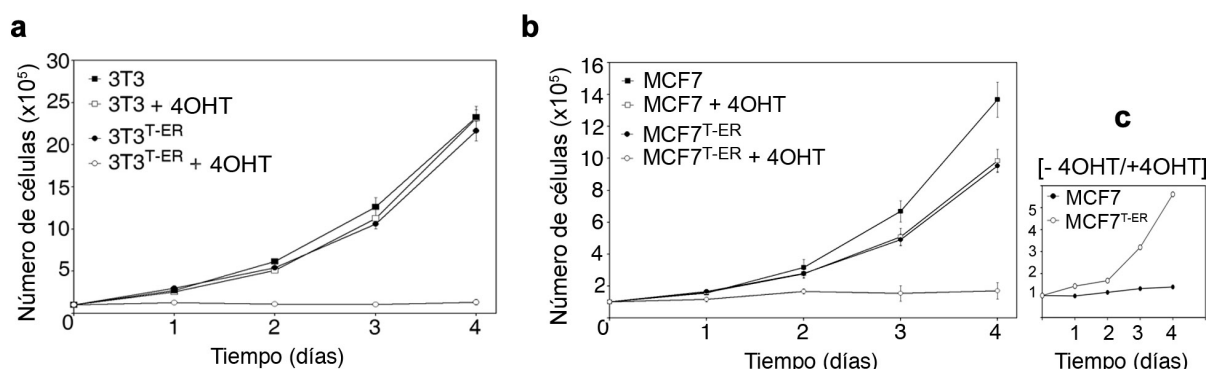
El mecanismo por el cual este proceso tenía lugar en respuesta a ATR apuntaba evidentemente a Chk1, ya que es el inductor esencial del checkpoint en G2 en respuesta al daño, mediante la fosforilación de las tres isoformas de cdc25 (Boutros et al., 2006). No obstante, a pesar de que la



fosforilación en la serina 345 en respuesta al daño genómico resulta necesaria para la actividad de Chk1 (Lopez-Girona et al., 2001; Zhao and Piwnicka-Worms, 2001), no está formalmente demostrado que sea suficiente. Se podría dar el caso de que otras modificaciones postraduccionales distintas a la fosforilación pudieran ser también necesarias para activar Chk1. Dado que en nuestro sistema no existía daño real podíamos estudiar el efecto de la fosforilación de Chk1 en ausencia de estas modificaciones. Para abordar esta cuestión utilizamos en primer lugar UCN-01, un inhibidor específico de Chk1 (Busby et al., 2000) conocido previamente por su capacidad de anular la parada en G2 (Wang et al., 1996). Así, incubando con UCN-01 observamos una clara desactivación del checkpoint G2/M en respuesta a OHT (figura 23, b). Para confirmar este resultado genéticamente redujimos los niveles de Chk1 con un siRNA y evaluamos el porcentaje de células mitóticas (figura 23, c). De nuevo el checkpoint G2/M en respuesta a 4OHT se vio parcialmente impedido, aunque de forma menos acusada que en el caso del inhibidor, probablemente por la menor eficacia del efecto del siRNA (figura 23, b c). Por lo tanto concluimos que la señal provocada por ATR era capaz de inducir un bloqueo específico en la transición G2/M dependiente de Chk1.

### 3.7. La señalización persistente de ATR detiene la proliferación e induce senescencia en NIH3T3 y MCF-7

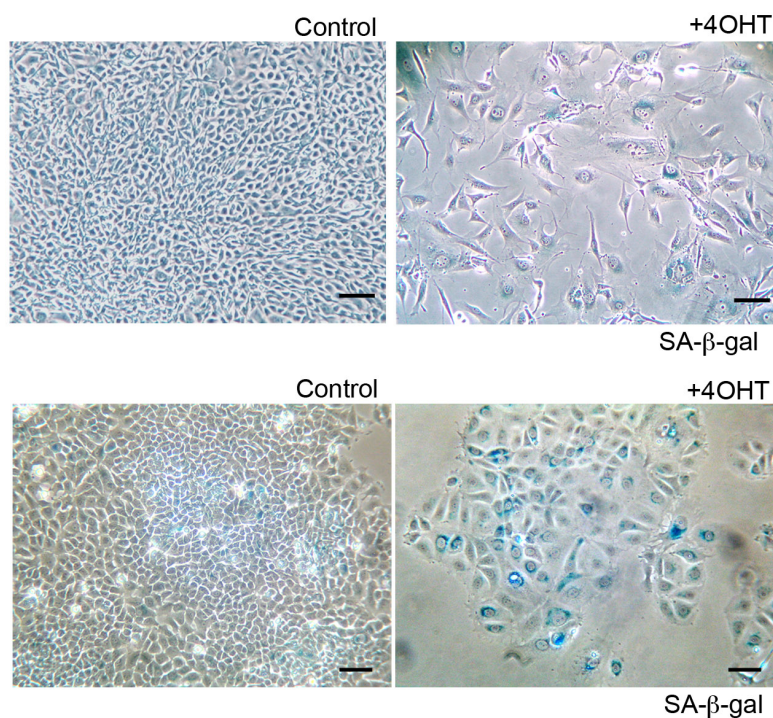
Vista la capacidad del sistema TAD<sup>ER</sup> para inducir los arrestos transitorios en G1 y G2, examinamos si la activación persistente de ATR detendría la proliferación celular y si ésta estaba asociada a la entrada en senescencia. Para ello realizamos contajes a diferentes días de células tratadas o no tratadas con 4OHT, introduciendo las líneas parentales como control adicional. Como se había observado en MEF, tanto 3T3<sup>T-ER</sup> como MCF7<sup>T-ER</sup> sufrieron un drástico arresto en presencia de 4OHT (figura 24, a y b).



**Figura 24 | La activación persistente de ATR detiene la proliferación celular en líneas inmortales. a,** Curvas de proliferación de NIH3T3 'T-ER' y silvestres en ausencia o presencia constante de 4OHT en el medio. **b,** Mismas curvas para MCF7. **c,** Representación de la proporción de número de células en b en presencia o ausencia de 4OHT, mostrando el efecto drástico de 4OHT en la línea MCF7<sup>T-ER</sup> en comparación a la silvestre.

## Resultados

Se observó un ligero retroceso en la tasa proliferativa de MCF-7 parentales debido a la sensibilidad natural de estas células a 4OHT (Wakeling et al., 1989), pero no comparable al inducido por TAD<sup>ER</sup> (figura 24, c). Además, únicamente como consecuencia de la activación de ATR se observó un cambio radical en la morfología celular de las células MCF7 a partir de las 72 horas, al igual que en 3T3<sup>T-ER</sup>, manifestándose todas las características de un fenotipo senescente. Confirmamos en ambas líneas celulares que este cambio morfológico estaba asociado a actividad  $\beta$ -galactosidasa (figura 25). Por lo tanto pudimos concluir que la señalización persistente de ATR es capaz de inducir la entrada en senescencia en células transformadas.

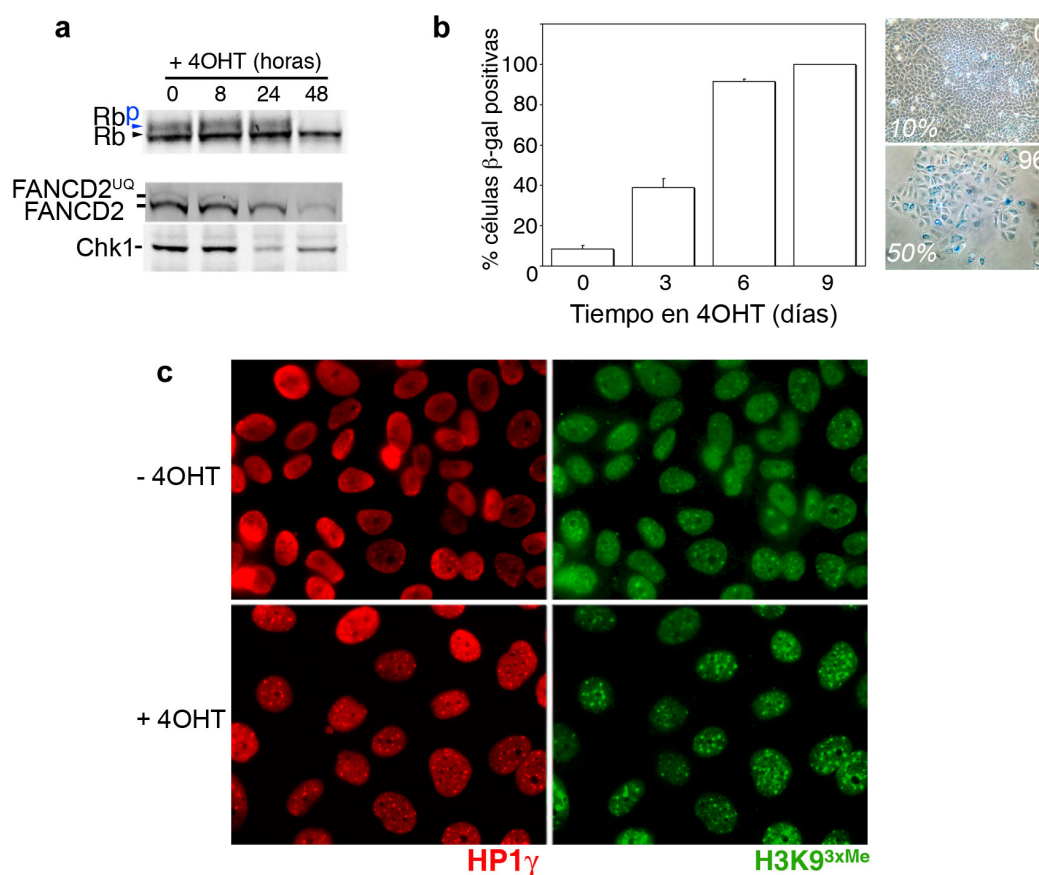


**Figura 25 | La activación persistente de ATR provoca senescencia en líneas inmortales.** Imágenes de campo claro de células en ausencia o presencia constante de 4OHT durante 4 días. Las células fueron plaqueadas a la misma confluencia. La tinción azul muestra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -gal).

### 3.8. La senescencia en la línea humana MCF7 viene acompañada de la activación de Rb y la aparición de SAHF

Del mismo modo, consideramos oportuno caracterizar más en detalle qué procesos estaban participando en la inducción de la senescencia en células humanas. Mientras que en ratón se considera que el eje de p53 es el principal conductor de la respuesta senescente, en humanos también se requiere la acción de Rb (Shay et al., 1991). La defosforilación de Rb, como resultado de la desaparición completa de señalización de las CDKs, provoca el secuestro de

E2F, inhabilitándose la entrada en fase S. Para que este proceso tenga lugar, se cree fundamental la expresión del inhibidor de CDKs p16 (Beausejour, 2003). Sin embargo, la línea MCF-7 tiene deletado el locus Ink4a, por lo que nos cuestionamos si la senescencia observada vendría asociada a la defosforilación de Rb. Para ello examinamos por WB el estado de Rb en MCF7<sup>T-ER</sup> tratadas con 4OHT de 1 a 72 horas. En efecto, entre las 24 y las 48 horas se produjo la completa defosforilación de Rb por activación de ATR (figura 26, a). De hecho, la morfología senescente no fue claramente apreciable en estas células hasta pasadas 72 horas, alcanzándose un máximo a los 7 días, con lo que existía una fina correlación con el estado de fosforilación de Rb (figura 26, b).



**Figura 26 | La senescencia en MCF7 está asociada a la defosforilación de Rb y generación de SAHF.** **a**, Defosforilación de Rb entre las 24 y las 48 horas de exposición a 4OHT en células MCF7T-ER. La desaparición de Chk1 o de la forma ubiquitinada de FANCD2 ocurren previamente, aunque son eventos claramente acordes a la inactivación total de las CDKs. **b**, El número de células senescentes (según tinción de SA-β-gal) fue aumentando progresivamente después de la parada permanente, hasta alcanzar un máximo aproximadamente una semana tras la adición de 4OHT. **c**, En las células senescentes se observa un drástico aumento en la intensidad de focos de HP1γ y H3K9 trimetilada, ambas marcas de heterocromatina asociadas a los SAHF.

Un sello distintivo en células humanas de la senescencia inducida por Rb es la aparición de focos de heterocromatina o SAHF (Narita et al., 2003). Se especula que estos focos pueden estar asociados al silenciamiento génico necesario para el mantenimiento del arresto del ciclo. Nos

preguntamos entonces si la sola activación de ATR en MCF7<sup>T-ER</sup> era capaz de generar SAHF. Teñimos MCF7<sup>T-ER</sup> en proliferación y MCF7<sup>T-ER</sup> senescentes con HP1 $\gamma$  y H3K9 trimetilada (H3K9<sup>triMe</sup>), marcadores clásicos de heterocromatina que se han visto concentrados en SAHF (Narita et al., 2003). En comparación con células en crecimiento, se observó un claro aumento en la intensidad y número de focos de HP1 $\gamma$  y H3K9<sup>triMe</sup> de forma homogénea en las células senescentes (figura 26, c). Por lo tanto pudimos concluir que la activación persistente de ATR es capaz de inducir la entrada en senescencia en células humanas recapitulando las características de un arresto permanente dependiente de Rb.

## 4. Expresión del sistema en un modelo animal

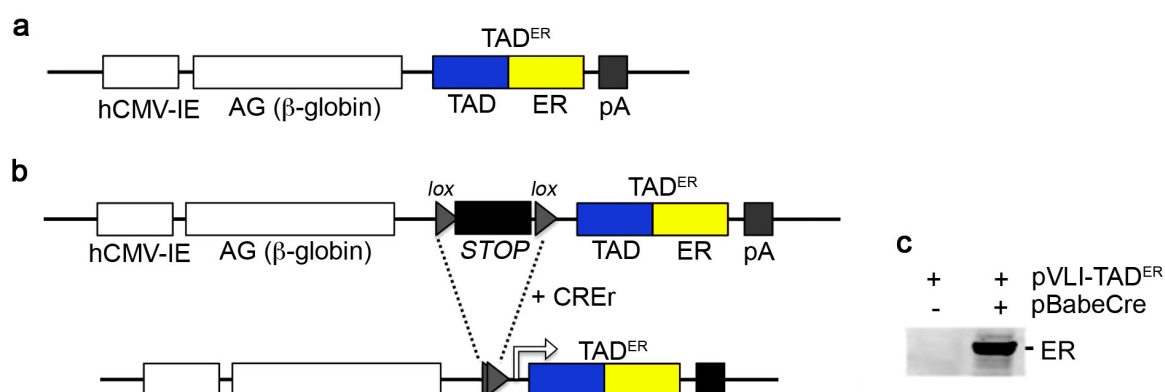
Para comprobar el verdadero potencial de ATR como supresor tumoral decidimos trasladar nuestro sistema a un modelo animal. Tras haber caracterizado el funcionamiento y las capacidades del sistema TADER en células en cultivo, el verdadero escenario donde debíamos probar las posibilidades de la DDR era en un verdadero tumor. La observación de que componentes fundamentales de la respuesta al daño se activan específicamente en tumores humanos incipientes, en las primeras etapas de la oncogénesis, ha llevado a proponer a la DDR como una barrera fundamental en la transformación maligna (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). Además, también ha sido posible detectar *in vivo* evidencias de senescencia en lesiones primarias (Collado et al., 2005). Estos resultados sugieren que el sistema basado en el TAD podría servir como supresor tumoral en los primeros estadios de la tumorigénesis, cuando la DDR es plenamente operativa. Por otro lado, en etapas posteriores del desarrollo tumoral la inducción de la DDR por TAD podría ser especialmente útil en carcinomas que han perdido p19ARF o PTEN, pero que conservan las rutas de activación de p53 en respuesta al daño intactas. Dado que podríamos controlar temporalmente el funcionamiento del sistema mediante la administración de 4OHT, sería posible activar ATR en los diferentes estadios de la transformación tumoral y examinar, como hemos hecho *in vitro*, los requerimientos genéticos y las capacidades de la DDR en un contexto *in vivo*.

Además de poder examinar la capacidad antitumorogénica de ATR *in vivo*, un modelo animal funcional nos permitiría disponer de cualquier tipo celular con el sistema TAD donde evaluar las consecuencias de una activación ectópica de la DDR en multitud de procesos fisiológicos. Así, otras respuestas celulares asociadas a la DDR, como la apoptosis y la diferenciación, podrían ser analizadas en un contexto exento de daño genómico (Inomata et al., 2009; Roos and Kaina, 2006). Además, la evidencia de que el estrés replicativo tanto en el ratón adulto como en el embrión se traduce en una severa aceleración del envejecimiento (Murga et al.,



2009; Ruzankina et al., 2007) sugiere que la activación ectópica persistente de ATR podría reproducir este fenómeno *in vivo*.

Decidimos generar dos modelos murinos transgénicos paralelamente. Teniendo en cuenta la estricta dependencia de los niveles de TAD<sup>ER</sup> para alcanzar una óptima activación de ATR en cultivo, apostamos por una transgénesis clásica para conseguir una alta expresión de la quimera. Nos basamos en el plásmido pCAGGS, que ya había sido testado en modelos anteriores dando niveles altos de expresión y de forma ubícua gracias al promotor combinado CMV-IE/AG (AG: intrón del gen activo de  $\beta$ -actina de pollo) (Okabe et al., 1997) (figura 27, a). Por un lado generaríamos una línea de expresión ubícua en la que controlar temporalmente la activación del sistema TAD<sup>ER</sup> mediante 4OHT, y en paralelo un modelo análogo condicional que nos permitiría expresar selectivamente el sistema para hacer estudios específicos de tejido o tipo celular. Este último vector (pVLI) estaba basado en el mismo plásmido pCAGGS, al que se le había incluido un casete de parada de la expresión escindible mediante la recombinasa CRE (figura 27, b). Cruzando esta línea con otra en la que la expresión de CRE estuviera dirigida por un promotor específico podríamos disponer del sistema TAD<sup>ER</sup> exclusivamente en un tejido o tipo celular determinado, teniendo además el control temporal de activación mediante 4OHT. Este modelo resultaría especialmente útil para evitar los posibles efectos adversos de la activación de ATR de forma sistémica.



**Figura 27 | Esquemas de los vectores pCAGGS y pVLI para la generación de modelos transgénicos.** **a**, Esquema del vector pCAGGS. El intrón del gen activo (Active Gene) de  $\beta$ -globina de pollo sirve junto a hCMV de promotor combinado, dando unos altos niveles de expresión **b**, Esquema del vector pVLI con el casete de parada de la transcripción/traducción. Con la expresión de la recombinasa CRE el casete es escindido y el gen puede expresarse. **c**, Prueba de expresión de ER por transfección transitoria de pVLI y pBabeCre en 293T

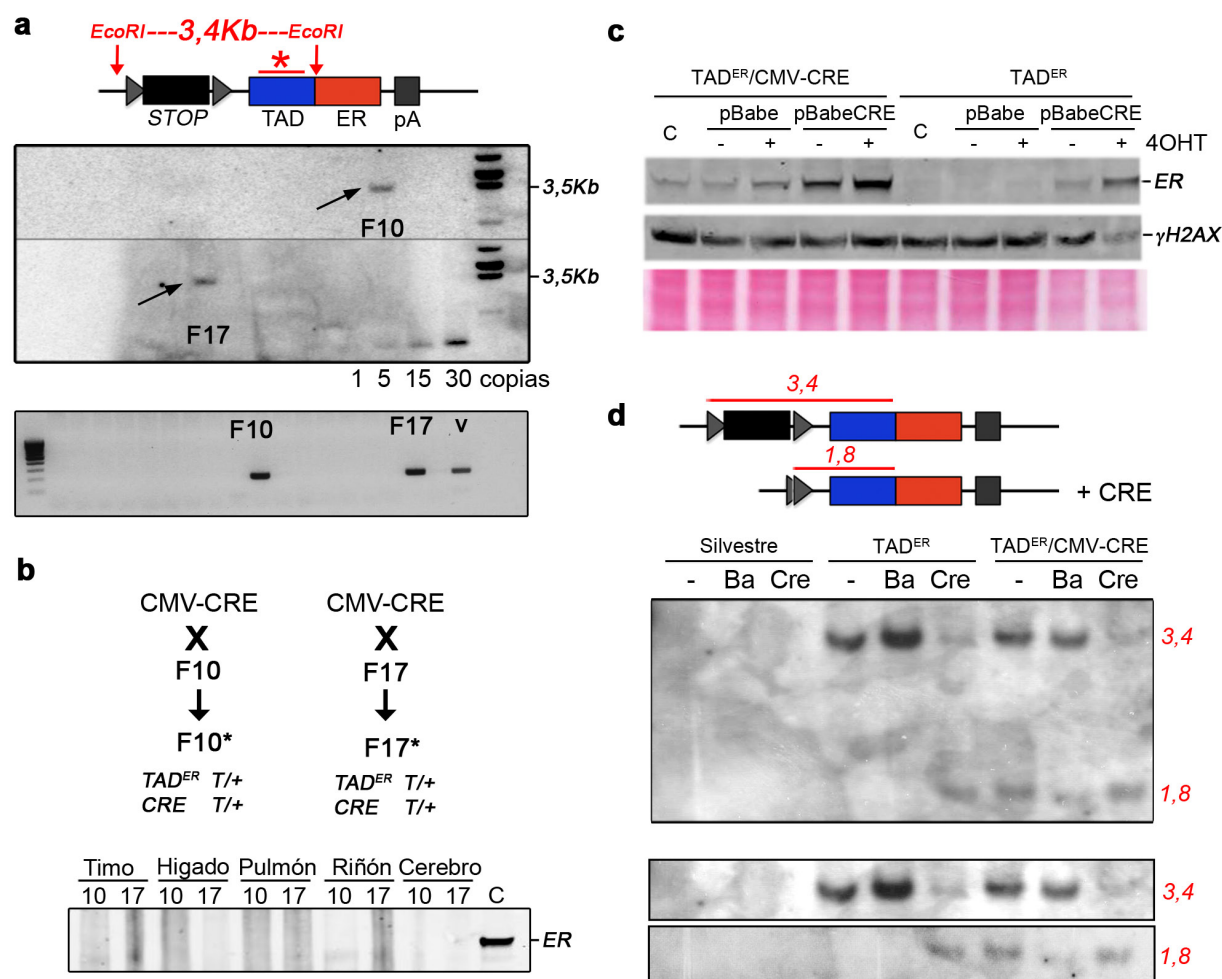
Se comprobó la expresión de la quimera TAD<sup>ER</sup> para ambos vectores *in vitro*, mediante transfección transitoria en células 293T (en el caso de pVLI cotransfectando con un vector de expresión de Cre) (figura 27, c). Efectivamente, en transfección transitoria ambos daban niveles

de expresión muy por encima de otros vectores de los que disponíamos, incluido el vector retroviral pMXPIE, lo que nos hacía confiar que obtendríamos valores similares en el ratón.

Los plásmidos fueron linearizados y microinyectados en oocitos de ratón. Tras la implantación en hembras receptoras se obtuvieron 19 (pCAGGS) y 18 (pVLI) crías, y se analizó la integración del transgén mediante southern blotting para identificar fundadores. En ambos casos se digirió ADN genómico con la enzima de restricción EcoRI, utilizando como sonda el mismo fragmento TAD de 950 pb (TopBP1<sup>978-1286</sup>). En el caso de la línea pCAGGS se identificó un solo fundador, que resultaba haber muerto una semana antes por causas no determinadas. A pesar de que las mutaciones presentes en el ERLBD (ERT2) habían sido introducidas para dotarlo de mayor especificidad por el 4OHT frente a otras hormonas, se podría pensar que la regulación del sistema fuera un poco permeable *in vivo* y hubiera causado la muerte. De hecho, intentamos obtener posteriormente quimeras mediante electroporación y selección de células madre embrionarias (ES) con una versión del vector resistente a puomicina, y de las únicas 7 colonias que obtuvimos ninguna expresaba el transgén.

En la línea pVLI se identificaron claramente 2 fundadores, tanto por southern blotting como por PCR (figura 28, a). Se generaron dos líneas análogas, las cuales se expandieron para hacer análisis de expresión en tejidos adultos. Para ello comenzamos cruzando nuestros animales con una línea transgénica constitutiva de CRE (CMV-CRE), con la que esperábamos expresar la quimera TAD<sup>ER</sup> de forma generalizada. Se seleccionaron dobles transgénicos genotipados por PCR y se analizó por WB los niveles de expresión del constructo en diferentes tejidos (figura 28, b). Sin embargo, no pudimos detectar expresión de TAD<sup>ER</sup> con el anticuerpo monoclonal contra ER, por lo que comprobamos si la recombinasa CRE estaba escindiendo eficientemente el casete de parada *loxSTOPlox*. Diseñamos una estrategia que nos permitiera evaluar el nivel de escisión por PCR, y detectamos escisión en ADN extraído de los mismos tejidos. Por lo tanto nuestra incapacidad para detectar la proteína podía deberse principalmente a que desde el sitio de integración el transgén no se estaba expresando eficientemente. Ya que reguladores epigenéticos podían estar silenciando el sitio de integración del vector en el ratón adulto, decidimos analizar la expresión de proteína y la actividad de CRE en fibroblastos embrionarios. Se aislaron MEF dobles transgénicos (TAD<sup>ER</sup> /CRE) y positivos sólo para TAD<sup>ER</sup>, y se infectaron con un vector retroviral que expresaba CRE para examinar los niveles máximos alcanzables de TAD<sup>ER</sup> en el caso de que la escisión endógena no estuviera siendo eficiente (figura 28, c). Detectamos la expresión de TAD<sup>ER</sup> en MEF dobles transgénicos, aunque los niveles eran realmente bajos (ya que cargamos gran cantidad de proteína en previsión). Aunque se consiguieron aumentar con la infección de CRE, no se alcanzaron niveles suficientes para inducir fosforilación de H2AX en presencia de 4OHT. Finalmente comprobamos por

southern blotting que la infección con CRE estaba escindiendo el casete casi al 100% (figura 28, d). Por lo tanto, aun con los niveles máximos de expresión posibles, la quimera TAD<sup>ER</sup> no era funcional. En este punto decidimos cancelar esta línea y desarrollar un nuevo modelo.

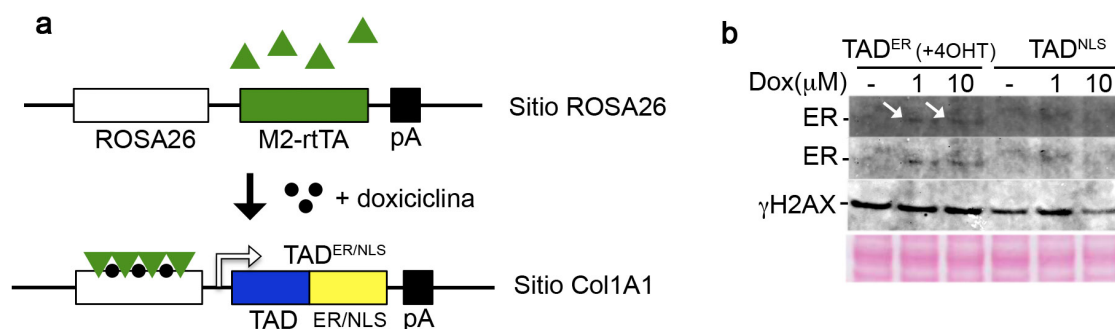


**Figura 28 | Modelo transgénico condicional para TADER.** **a**, Genotipado de los ratones transgénicos e identificación de dos positivos (Fundadores 10 y 17) tanto por Southern Blot como por PCR. Se muestra la estrategia para el Southern Blot, utilizando como sonda el cDNA de TopBP1 978-1286. Para evaluar el número de copias integradas se incluyó una curva patrón con cantidades crecientes equivalentes de ADN control. **b**, Cruces de estos ratones con la línea CMV-Cre y análisis de expresión de la quimera en diferentes tejidos por WB. En comparación al control, no se observa expresión. **c**, Análisis de expresión de la quimera en MEF. Se utilizaron MEF TAD<sup>ER</sup> y TAD<sup>ER</sup>/CRE para evaluar si se podía aumentar los niveles de escisión. No pudimos detectar activación del sistema tras la adición de 4OHT. **d**, Análisis por Southern Blot de los niveles de escisión del casete en MEF, de forma análoga al apartado **c**.

Optamos por cambiar el modelo condicional por uno inducible basado en el sistema Tet/ON. En este caso en vez de necesitar la acción de la recombinasa CRE podíamos inducir la expresión de nuestro transgén mediante la administración a los ratones de doxiciclina (análogo de la tetraciclina). Este sistema ha dado resultados de expresión muy robustos para otros genes, por lo que resultaba un modelo en principio idóneo para nuestros intereses (Beard et al., 2006;

## Resultados

Hochedlinger et al., 2005). Además el sistema Tet/ON tiene la ventaja de que se puede revertir la expresión del transgén retirando la doxyciclina. La metodología desarrollada por Beard y colaboradores permite obtener fácilmente colonias de células madre embrionarias en las que el transgén se integra mediante recombinación catalizada por flipasa (Beard et al., 2006). Estas células tienen integrado en el sitio Col1A1 unas secuencias de recombinación que con la cotransducción de flipasa permiten obtener cerca de un 100% de colonias positivas. Por otro lado el transactivador sensible a tetraciclina se expresa de forma estable desde el sitio ROSA26 en estas células, asegurando una eficiente inducción tras la adición de doxyciclina (figura 29, a). Clonamos en el vector necesario para la recombinación dos versiones del sistema TAD. Por un lado la quimera con ERT2, que nos daría doble control con 4OHT, y una versión simplificada con una secuencia de localización nuclear (NLS). Ya que el sistema es inducible de por sí, consideramos la opción de que un TAD directamente nuclear podría ser más eficiente, en el caso de que tuviéramos de nuevo problemas de expresión.



**Figura 29 | Expresión de las fusiones TAD-ER/NLS en células ES bajo el control de doxyciclina.** **a**, Esquema del sistema Tet/ON integrado en las células ES. El transactivador rtTA se expresa desde el sitio ROSA26 (promotor ROSA26) y el transgén se integra en el sitio Col1A1. Tras la adición de doxyciclina se induce la expresión (sistema Tet/ON). **b**, Análisis de expresión de TAD<sup>ER</sup> e inducción de γH2AX. Se incubaron las colonias positivas (se muestra sólo una de cada sistema) con doxyciclina 1 y 10 μM durante 24 horas.

Tras la electroporación de ambos vectores obtuvimos 18 colonias de cada uno, de las cuales resultaron ser positivas casi el 100% (mediante una PCR que detectaba la recombinación del vector). Ya que nuestro propósito era obtener unos niveles de expresión suficientes y, si fuera posible, evidencias de actividad ATR, testamos directamente por WB tanto la presencia de TAD<sup>ER</sup> como de γH2AX en las colonias de ES (en el caso de TAD-NLS nuestra prueba sería directamente la actividad medida por γH2AX). Se trataron las células combinando doxyciclina 1 y 10 μM (1 μM es ya concentración saturante para el sistema Tet/ON) y 4OHT durante 24 horas. Los niveles de expresión en ES resultaron tan bajos que apenas pudimos detectar una sutil banda para el TAD<sup>ER</sup>, no viendo ninguna inducción de γH2AX ni en el modelo TAD<sup>ER</sup> ni en el TAD-NLS. A pesar de que no podíamos estar seguros de que la expresión en ES fuera

reflejo de aquella en el ratón adulto, los niveles detectados estaban órdenes de magnitud por debajo de los necesarios para activar ATR. Por lo tanto decidimos paralizar también el trabajo en este modelo.

Comenzamos a ser conscientes de que el sistema TAD tiene una gran limitación de cara a su funcionalidad *in vivo*. Alcanzar los niveles de expresión necesarios en un animal es técnicamente complicado, de modo que en este momento tenemos dos estrategias alternativas en desarrollo:

- Por un lado vamos a retomar la estrategia clásica del transgénico condicional, introduciendo en este caso un casete de resistencia en el vector (puromicina o G418/neomicina), de forma que analizaremos a gran escala colonias transducidas con adenovirus expresando CRE. Nuestro vector pCAGGS-*puro*, que resultó ser de algún modo letal en ES, dio buenos resultados en líneas estables en cultivo, por lo que confiamos que con esta modificación obtengamos colonias con niveles óptimos de expresión.
- Dada la inherente limitación molecular del sistema TAD para activar eficientemente a ATR, estamos diseñando diferentes modificaciones del sistema en base a nuestras observaciones experimentales (ver discusión). Estas quimeras modificadas serán testadas primero en cultivo, y esperamos poder aumentar la eficacia alostérica del TAD de forma que los niveles de expresión ya no sean un factor limitante.

## 5. Aplicaciones del sistema de activación artificial de ATR

Con el dominio de activación de TopBP1 regulado por 4OHT hemos demostrado que existe la posibilidad de circunvalar los mecanismos de regulación endógena en células de mamífero, y activar a ATR en ausencia total de daño e independientemente de la fase del ciclo. Dicho de otro modo, podría tratarse como un sistema general para activar la DDR de manera inducible. Si la activación es eficiente, se puede provocar una cascada de fosforilaciones capaz de establecer los checkpoints canónicos de respuesta al daño. Si persiste la activación ectópica, el arresto continuado se traduce en una parada en la proliferación que desemboca en un arresto permanente o senescencia.

La posibilidad de activar una DDR a voluntad sin efectos dañinos para el ADN permitía experimentar con la señalización de ATR en cualquier proceso celular. Además, el sistema se presentaba como una potente herramienta para responder preguntas básicas con un enfoque novedoso. En base a estas ideas desarrollamos tres proyectos paralelos que, a pesar de basarse en el mismo principio, intentaban responder a preguntas muy dispares.

- ¿Puede la señalización de ATR aumentar la eficiencia de reparación y aliviar la severidad de fenotipos radiosensibles?
- ¿Es la senescencia un estado irreversible?
- ¿Puede utilizarse ATR como una diana terapéutica en la lucha contra el cáncer?

En los siguientes apartados se presenta la hipótesis, el trabajo realizado y los objetivos futuros de estos proyectos.

### **5.1. ¿Puede utilizarse el sistema basado en TAD para estimular la reparación de DSB?**

De las tres PIKKs principales, DNA-PK es la única implicada directamente en reparación, contribuyendo a la eficiencia del mecanismo de NHEJ. Por otro lado, ATM y ATR son las responsables de activar los checkpoints, y, además de estimular la reparación, su función señalizadora es fundamental para la correcta coordinación entre arresto proliferativo y resolución de las lesiones. La señalización de estas quinasas regula y estimula la reorganización de la cromatina en las inmediaciones de las rupturas, necesaria para la generación de focos de proteínas involucradas en señalización y reparación. Sin actividad ATM las carencias en el checkpoint vienen acompañadas de una ineficiente formación de focos, la cual se traduce en una cinética más lenta de reparación (Kuhne et al., 2004; Xu and Baltimore, 1996). Además, las células sin ATM exhiben una incapacidad para reparar un cierto tipo de DSB, ya que rupturas visibles como focos de daño persisten a tiempos largos, incluso más que en células con NHEJ deficiente (Kuhne et al., 2004). La combinación de estos problemas es la causa de la hipersensibilidad a la radiación y la inestabilidad cromosómica de los pacientes de Ataxia-Telangiectasia. La evidencia de que ATM y ATR fosforilan directamente multitud de substratos implicados en reparación (Matsuoka et al., 2007) plantea la posibilidad de que la señalización de estas quinasas pueda cooperar en la resolución de las rupturas. Ya que en nuestro sistema ATR puede complementar funcionalmente a ATM, ¿sería entonces la activación de ATR capaz de estimular la reparación en células ATM -/-?



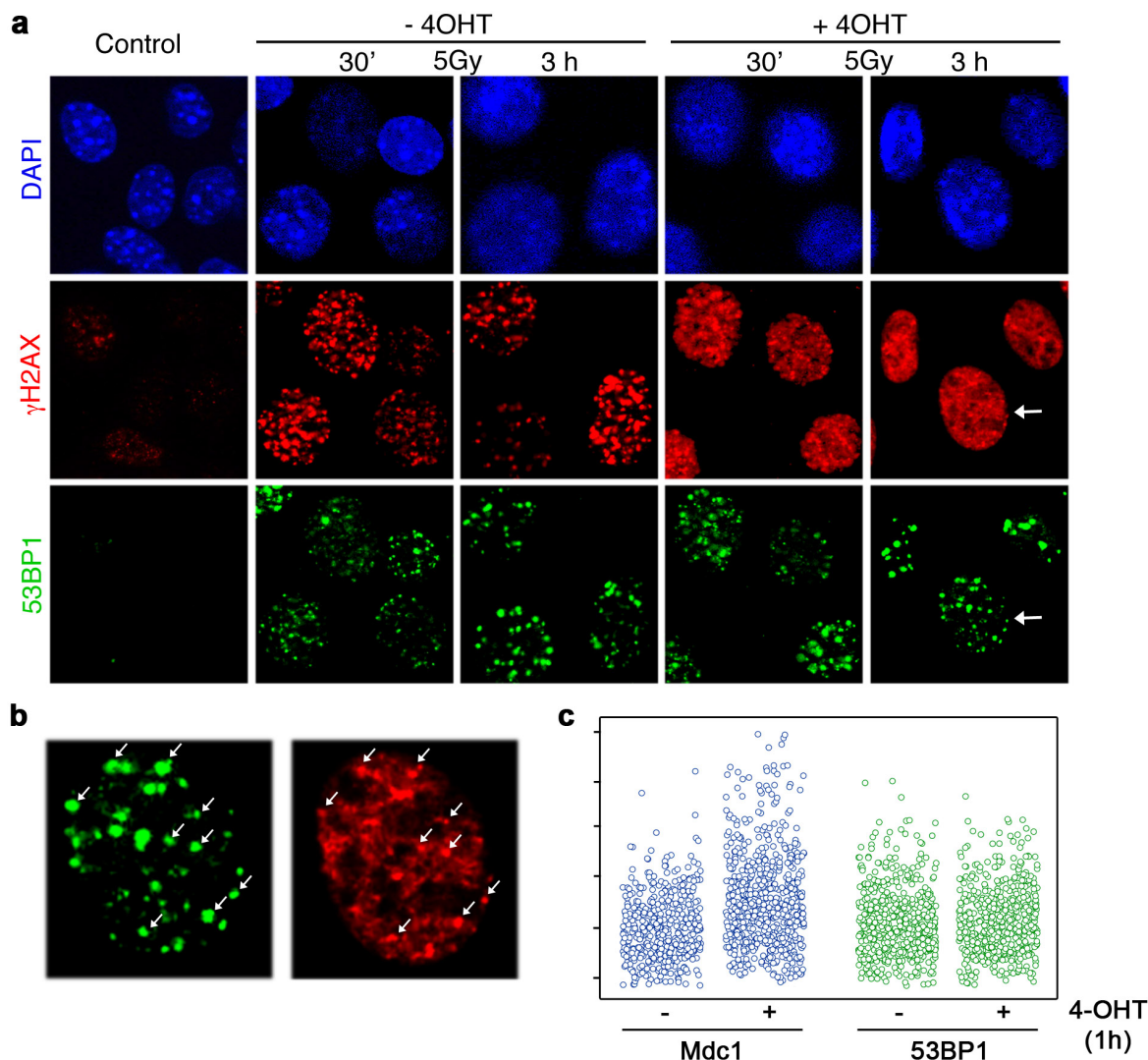
Algunas de nuestras observaciones apoyan esta posibilidad. La señalización generada por ATR en respuesta a TAD es aditiva a la resultante por radiación ionizante (figura 11, b), lo que sugiere que puede aportar un “extra” de capacidad quinasa a procesos regulados por fosforilaciones e interacciones entre fosfopéptidos, como es la reparación de DSB. Además, la señal de ATR en respuesta a TAD<sup>ER</sup> se produce en todo el ciclo y alcanza la cromatina al completo, lo que sugiere que no está limitada ni espacial ni temporalmente para interaccionar con los DSB.

En base a estas observaciones, decidimos abordar experimentalmente nuestra hipótesis, examinando en primer lugar si la actividad extra de ATR podría facilitar la reparación de DSB en los clones 3T3<sup>T-ER</sup> y MCF7<sup>T-ER</sup>.

### 5.1.1. La fosforilación deslocalizada de H2AX no influye en la formación de focos

Para medir si la activación ectópica extra de ATR era capaz de mejorar la eficiencia de reparación de DSB producidos por radiación ionizante, examinamos la formación de focos de 53BP1. La eficiencia comprometida de las células ATM<sup>-/-</sup> se refleja perfectamente en 53BP1 como marcador de focos. La ausencia o inhibición de ATM provoca un retardo en el establecimiento así como un menor número de focos de 53BP1 (Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000), por lo que es un indicador claro del efecto de la señalización en la gestión de los DSB. De hecho 53BP1 se acumula en focos persistentes asociados a DSB no reparados, por lo que nos serviría para medir la eficiencia también en este tipo de rupturas. Otro parámetro ampliamente estudiado como medida de reparación es la cinética de focos de  $\gamma$ H2AX. En nuestro caso no era posible utilizar  $\gamma$ H2AX como marcador de focos ya que quedarían enmascarados por la tinción pan-nuclear provocada por ATR. De hecho, nos preguntamos si la aparición de  $\gamma$ H2AX por todo el núcleo podía confundir el proceso de reclutamiento de factores a las rupturas, al ser  $\gamma$ H2AX uno de los pivotes centrales en la generación de focos en respuesta a IR. Además, la fosforilación en la serina 139 es suficiente para interaccionar con MDC1, lo que realmente planteaba la posibilidad de que la señalización de ATR pudiera, en vez de mejorar, comprometer el ensamblaje de los focos y la reparación de DSB. Analizamos entonces la generación de focos tanto de  $\gamma$ H2AX como de 53BP1 en células previamente tratadas con 4OHT. Una hora antes de irradiar (5Gy) añadimos 4OHT al medio de cultivo de 3T3<sup>T-ER</sup> y observamos el patrón de distribución de  $\gamma$ H2AX y 53BP1 30 minutos y 3 horas después de la irradiación. En ambos casos observamos una tinción homogénea de  $\gamma$ H2AX en respuesta a 4OHT, y, sin embargo, sobre esta tinción aun era posible diferenciar focos brillantes de  $\gamma$ H2AX

colocalizando con 53BP1 en células irradiadas (figura 30 a, b). Por lo tanto la formación de focos no estaba impedida por la fosforilación pannuclear de H2AX.



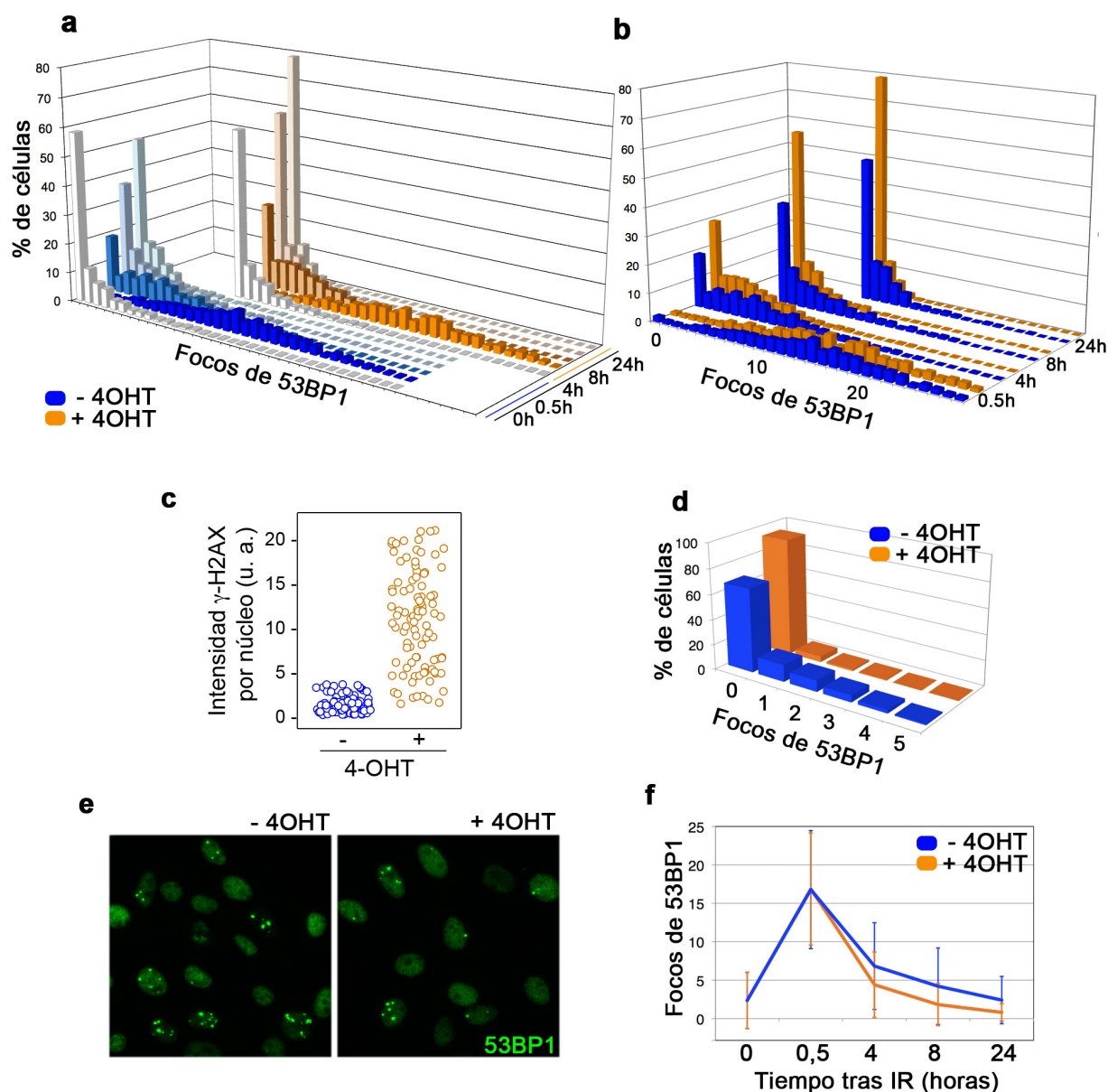
**Figura 30 | Formación de focos con  $\gamma$ H2AX pannuclear.** **a**, Inmunofluorescencia de células irradiadas con 5 Gy a 30 minutos y 3 horas. Una hora antes de irradiar se añadió 4OHT. **b**, Detalle de un núcleo con  $\gamma$ H2AX deslocalizada 3 horas después de irradiar (flecha en figura a, +4OHT 3h). Los niveles se han corregido para visualizar los focos brillantes de  $\gamma$ H2AX que colocalizan con 53BP1. Se señalan algunos de estos focos con flechas. **c**, Análisis de HTM de la intensidad de Mdc1 y 53BP1 unido a la cromatina en células sin tratar o tratadas 1 hora con 4OHT.

De hecho, la sola activación de ATR provocaba que  $\gamma$ H2AX interaccionara con MDC1 de forma homogénea, como observamos por el ligero incremento de la retención de MDC1 en la cromatina, pero no se observó tal para 53BP (figura 30, c). Este resultado estaría en consonancia con el modelo actual, según el cual, si bien MDC1 se une directamente a  $\gamma$ H2AX (Stucki et al., 2005), el reclutamiento de otros factores como RNF8 y RNF168 es necesario para los focos de 53BP1 (Doil et al., 2009). Esta cadena de reclutamientos requeriría eventos que sólo tienen lugar en los DSB, por lo que no interferiría con la fosforilación dispersa de H2AX.



### 5.1.2. EL sistema TAD<sup>ER</sup> estimula la reparación de DSB

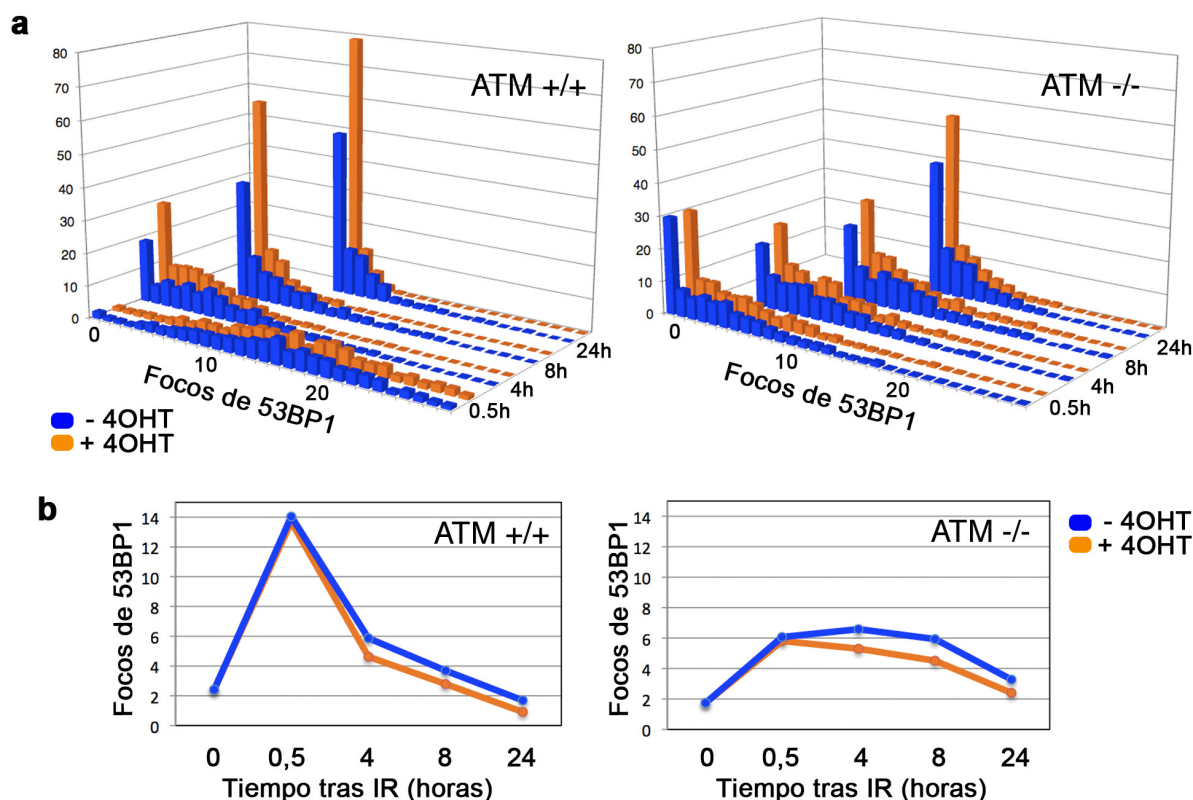
Visto que la activación de ATR no impide la normal detección de los DSB y la formación de focos, evaluamos si mejoraba la eficiencia de reparación. Para ello decidimos tratar las células 3T3<sup>T-ER</sup> con 4OHT 1 hora antes o justo después de ser irradiadas con 1Gy. Elegimos esta dosis de radiación porque provoca un número de focos por célula fácilmente cuantificable, de forma que se pudieran generar datos consistentes mediante HTM. Por otro lado activar ATR antes de irradiar nos permitiría evaluar cuantitativamente su efecto en el establecimiento de los focos de 53BP1 (que suelen alcanzar un máximo a los 30 minutos aproximadamente), mientras que si lo hacemos justo después de la irradiación estaríamos evaluando el papel de ATR estrictamente en la etapa en que los focos comienzan a remitir. Se irradiaron todas las células al mismo tiempo y se fijaron 30 minutos, 4, 8 y 24 horas después. Teñimos para 53BP1 y se tomaron imágenes de cada condición de forma automatizada y aleatoria (figura 31 a, b). Una tinción paralela para  $\gamma$ H2AX nos sirvió de control de activación de ATR (figura 31 c) Posteriormente se utilizó un software de análisis con el que pudimos realizar el conteo automatizado e imparcial de focos dentro de cada núcleo. Así pudimos representar mediante histogramas las curvas de distribución de número de focos de entre 1000 y 2000 células por condición, obteniendo una detallada cinética de reparación (figura 31 a, b). En ambos tratamientos con 4OHT se obtuvieron valores equivalentes, resultando en un claro aumento de la eficiencia de reparación. Tanto a 4, 8 y 24 horas todas las células tenían menos focos que en ausencia de 4OHT (figura 31, b), poniéndose de manifiesto que era un fenómeno generalizado. Especialmente interesante era el claro incremento de células con 2, 1 o ningún foco, o, dicho de otro modo, células sin ningún daño detectable. De hecho, los focos generados por estrés replicativo basal en células proliferantes también remitieron (figura 31, d). Contrastamos manualmente la fiabilidad del sistema automatizado de conteo, observando a simple vista la diferencia en número de focos en presencia o ausencia de 4OHT (figura 31, f). Comparando las cinéticas de reparación con los valores medios pudimos observar que la principal diferencia de eficacia tenía lugar en las 4 primeras horas (figura 31, f). Reprodujimos el experimento en MCF7<sup>TE-R</sup> (datos no mostrados, equivalentes) y obtuvimos el mismo resultado, sugiriendo que un subtipo de DSB provocados por IR podría estar siendo reparado más eficientemente.



**Figura 31 | Reparación de DSB estimulada por TAD** **a**, Cinéticas de reparación en células tratadas o no tratadas con 4OHT. Los diagramas muestran la distribución en función del número de focos de 53BP1 en células irradiadas con 1 Gy a los diferentes tiempos. El 4OHT se añadió en el momento de la irradiación. **b**, Diagrama comparativo (alternativo a 'a') de número de focos en células sin tratar o tratadas con 4OHT a cada tiempo. **c**, Control de la activación de ATR medida por fosforilación de H2AX (4 horas de 4OHT). **d**, Distribución de número de focos de 53BP1 en células sin irradiar tratadas (4 horas) o no tratadas con 4OHT. **e**, Imagen representativa de focos de 53BP1 en células irradiadas sin o con 4OHT (8 horas). **f**, Media de número de focos de 53PB1 a los diferentes tiempos.

### 5.1.3. La activación de ATR por TAD<sup>ER</sup> estimula la reparación en células carentes de ATM

Una vez comprobado que la señalización de ATR estaba mejorando la eficacia en la reparación, analizamos si también sería posible en células ATM<sup>-/-</sup>. Para ello infectamos y seleccionamos MEF silvestres y ATM<sup>-/-</sup> con el retrovirus de TAD<sup>ER</sup>, y realizamos el mismo ensayo de focos de 53BP1 en presencia o ausencia de 4OHT (con la tinción control de activación de  $\gamma$ H2AX). Resultó llamativa la diferencia en la cinética de reparación entre ambos genotipos, como había sido observado por otros grupos (Rappold et al., 2001). Por la deficiente señalización muchos DSB no llegan a formar focos en células ATM<sup>-/-</sup>, fenómeno que se hace más evidente a dosis bajas de irradiación. De nuevo, observamos que en respuesta a 4OHT se mejoraba ostensiblemente la eficiencia en las primeras horas de reparación en MEF silvestres y ATM<sup>-/-</sup> (figura 32, a, b). Mientras que en términos absolutos la mejora era equivalente en ambos casos, para las células ATM<sup>-/-</sup> suponía que a las 4 horas ya había reparación efectiva en presencia de 4OHT.



**Figura 32 | Reparación de DSB estimulada por TAD en ausencia de ATM. a,** Cinéticas de reparación análogas a la figura 31b en MEF silvestres o deficientes en ATM, tratados o no tratados con 4OHT. **b,** Media del número de focos de 53BP1 a los diferentes tiempos.

Considerando que estas células tienen comprometido tanto el checkpoint G1/S como el G2/M tempranos en respuesta a IR, la reparación inducida por ATR podría ser importante para reducir las consecuencias de rupturas no solucionadas que atraviesan los checkpoints en esa ventana de tiempo. Además, a las 24 horas de la radiación la media de focos en los MEF ATM<sup>-/-</sup> con 4OHT casi había disminuido hasta el nivel basal (2.3 y 1.7), aumentando en un 15% el número de células sin daño respecto a las no tratadas con 4OHT. Este dato sugiere que ATR podría reducir el número de DSB persistentes en células ATM<sup>-/-</sup>, contribuyendo a aliviar la inestabilidad genómica causada por la ausencia de ATM.

### 5.2. ¿Es la senescencia reversible?

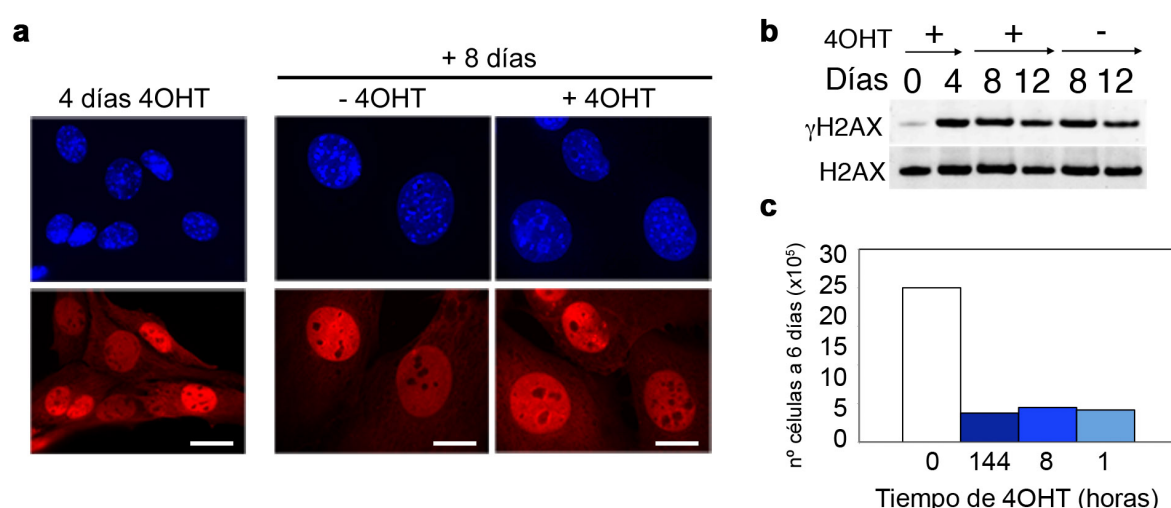
Diferentes tipos de estrés, como el acortamiento excesivo de los telómeros, altos niveles de ROS, el uso de quimioterapia o la activación de oncogenes, son capaces de inducir senescencia en células en cultivo. En todos estos procesos está implicado en mayor o menor grado el daño en el ADN. A diferencia de los checkpoints, que son un arresto transitorio, se ha postulado que la senescencia es un estado no proliferativo irreversible, pero poco o nada se sabe de cómo ese estado se mantiene. Diferentes trabajos han tratado de determinar los efectores que inducen el arresto permanente para intentar probar que la senescencia se puede revertir si esos efectores son eliminados a posteriori. En algunos casos la inhibición de p53 es suficiente para reiniciar la proliferación celular, pero siempre y cuando esto se haga antes de que se llegue a expresar p16Ink4a (Beauséjour et al., 2003). Éste resultado sugiere que en realidad la senescencia es un estado terminal irreversible que es alcanzado en un periodo de tiempo relativamente aleatorio en función del tipo e intensidad del estímulo, y que existen fases presenescentes que son parcialmente reversibles (Ferbeyre et al., 2002). Así, los trabajos que defienden la reversibilidad se basan en el aumento de proliferación observado a largo plazo como consecuencia de la eliminación de p53/p16/Rb (Dirac, 2003; Gire and Wynford-Thomas, 1998). No obstante, no discriminan rigurosamente que esta proliferación no se deba a la existencia de células presenescentes en el cultivo, y en ocasiones no marcan la diferencia entre escapar de la senescencia (no llegar a entrar) y revertirla. Por lo tanto, la verdadera incógnita es si existe un programa epigenético celular irreversible -que ya no requeriría de los efectores como p53/p16/Rb-, o si la senescencia es mantenida por la persistencia del estímulo que inicialmente provocó la parada proliferativa. En la práctica, estas dos opciones no se pueden estudiar debido precisamente a la presencia de daño permanente en células senescentes (D'adda Di Fagagna et al., 2003; Di Micco et al., 2008; Herbig et al., 2004; Sedelnikova et al., 2004). A diferencia de en el caso de oncogenes, ROS, o acortamiento de los telómeros, la senescencia provocada por ATR

en respuesta a TADER no genera daño en el ADN. Por ello era un buen modelo para plantear la reversibilidad de la senescencia, ya que podríamos eliminar completamente la fuente del estímulo simplemente apagando la señal de ATR.

### 5.2.1. El sistema TADER no es funcionalmente reversible

Decidimos utilizar una línea inmortal clonal porque permitía discriminar con mucha mayor fiabilidad el arresto de la proliferación que en MEF primarios, ya muy estresados del cultivo en placa. Además, la necesidad de trabajar con infecciones policlonales en MEF, con diferentes niveles de TAD<sup>ER</sup>, dificultaba enormemente la eficiencia de los ensayos.

Dada la naturaleza alostérica de la inducción ejercida por el TAD, en principio sería posible apagar la señal de ATR simplemente revirtiendo la traslocación de TAD<sup>ER</sup>. El experimento era inicialmente fácil de abordar, puesto que ya otros trabajos habían demostrado la reversibilidad de las proteínas quiméricas con ERT2 si se elimina el 4OHT (Christophorou et al., 2005). Para ello tratamos células 3T3<sup>T-ER</sup> con 4OHT durante 4 días, tiempo suficiente para observar el fenotipo senescente, y seguidamente retiramos el medio de cultivo, substituyéndolo por medio fresco con o sin 4OHT. No observamos ningún cambio en la morfología ni signos de aumento en la proliferación incluso 10 días después de retirar el 4OHT. Decidimos comprobar entonces por inmunofluorescencia si efectivamente TAD<sup>ER</sup> había revertido y la señalización de ATR ya no estaba presente. Al contrario, pudimos observar que, al igual que en las células expuestas a 4OHT constantemente, la localización de TAD<sup>ER</sup> seguía siendo nuclear y los niveles de H2AX no habían disminuido en ausencia de 4OHT (figura 33, a, b). Comprobamos que en efecto el medio de cultivo no contenía trazas de 4OHT que pudieran estar induciendo la traslocación.



**Figura 33 | La traslocación del sistema TAD<sup>ER</sup> no es reversible.** **a**, Inmunofluorescencia de células 3T3<sup>T-ER</sup> en la que se muestra la localización de la quimera TAD<sup>ER</sup> tras 4 días de tratamiento con 4OHT y 8 días después en presencia o ausencia de 4OHT. **b**, Fosforilación de H2AX que muestra la activación de ATR incluso en ausencia de 4OHT. **c**, Proliferación celular en presencia constante de 4OHT (144) o con pulsos de 1 u 8 horas.

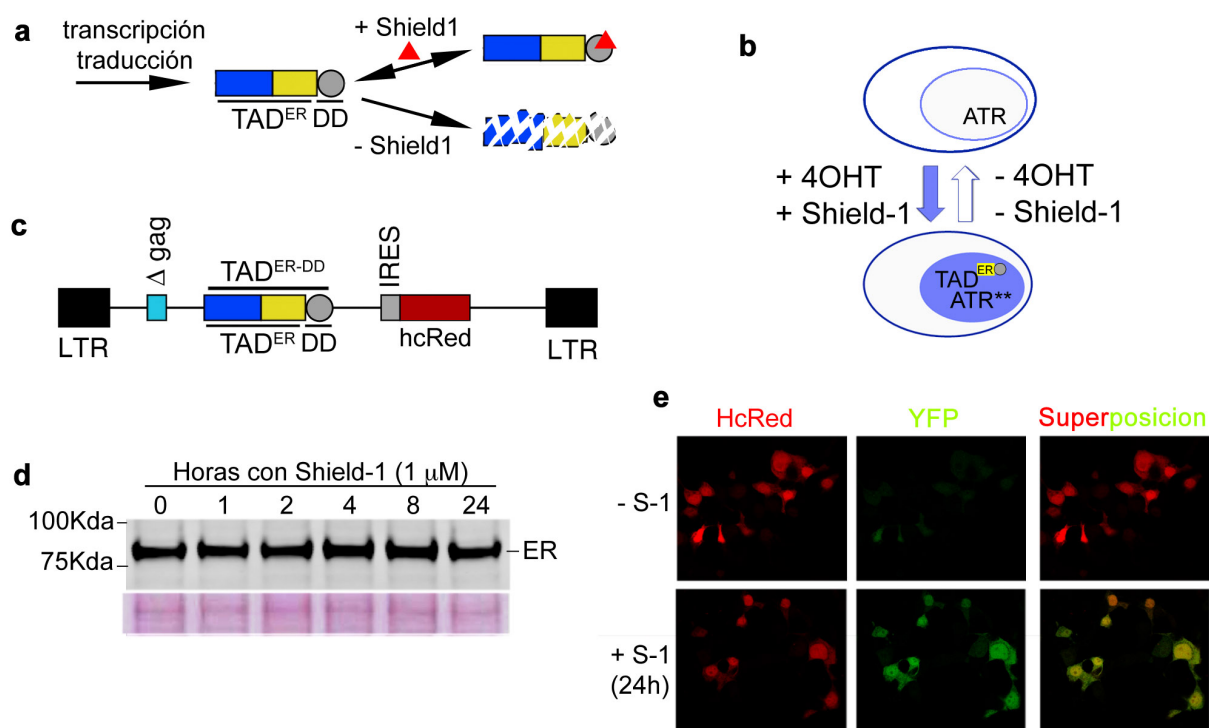


## Resultados

Para descartar que la causa de la irreversibilidad fuera algún artefacto del estado senescente realizamos curvas de proliferación de 3T3<sup>T-ER</sup> en presencia constante de 4OHT o con pulsos discretos de 1 hora y 8 horas. En las tres condiciones las células dejaron igualmente de proliferar y entraron en senescencia (figura 33, c), con lo que concluimos que la traslocación de la quimera TAD<sup>ER</sup> una vez inducida por 4OHT es irreversible.

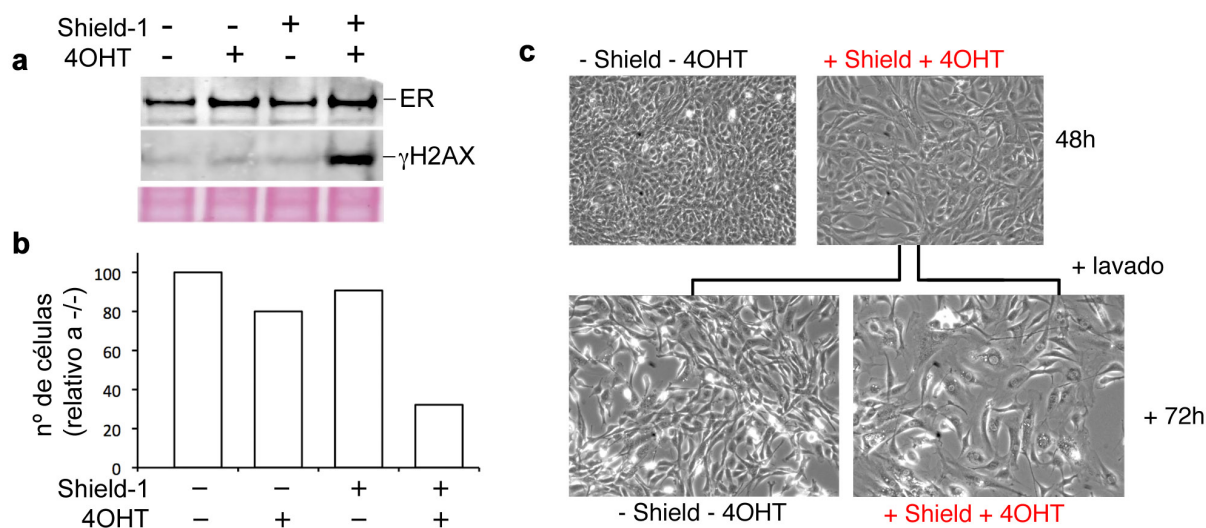
### 5.2.2. Desarrollo de un sistema inducible y reversible

Decidimos entonces desarrollar un nuevo sistema que sí se comportara de manera reversible. Dados los buenos resultados que habíamos tenido a niveles de inducción con el sistema de 4OHT, consideramos razonable no variar mucho el modelo e intentar modificar la quimera TAD<sup>ER</sup> para que fuera reversible. Para ello incluimos en el extremo C terminal un dominio regulable de desestabilización con el cual controlar, además de la localización, los niveles de TAD<sup>ER</sup> (Banaszynski et al., 2006).



**Figura 34 | Funcionamiento del sistema TAD<sup>ER-DD</sup>.** **a**, Funcionamiento del dominio desestabilizador (DD). La proteína fusionada al DD se expresa, pero es rápidamente degradada en ausencia de Shield-1. La estabilización proporcionada por la interacción con Shield-1 es reversible retirando el ligando del medio. **b**, Modelo de actuación de TAD<sup>ER-DD</sup>. En presencia de Shield-1 se puede activar ATR tras la adición de 4OHT. Para revertir la activación se retira el Shield-1, degradando la quimera. **c**, Vector retroviral en el que se construyó la quimera con el DD. **d**, Niveles de proteína en ausencia o presencia de Shield-1. **e**, Estabilización de la fusión YFP-DD por la adición de Shield-1. La intensidad de HcRed, no dependiente de Shield-1, sirve para normalizar ambas condiciones.

Este pequeño polipéptido (DD de Dominio de Desestabilización), de apenas 91 aminoácidos, desestabiliza la proteína a la que esté unido, haciendo que los niveles sean prácticamente nulos. Sólo cuando se añade una pequeña molécula al medio (Shield-1) la quimera queda protegida de la degradación por el proteasoma, aumentando sus niveles rápidamente (figura 34, a). De esta forma podíamos disponer de un sistema funcional en presencia de Shield-1 y 4OHT, y reversible retirando Shield-1, apagando de esta forma la señalización de ATR (figura 34, b). Clonamos TAD<sup>ER</sup> en el vector retroviral con el DD en 3', generando el transgén TAD<sup>ER-DD</sup> (figura 34, c). En primer lugar infectamos fibroblastos NIH3T3 para confirmar la funcionalidad del sistema. Esta vez contábamos con un reportero de emisión en el rojo lejano, con el cual pudimos seleccionar una población de altos niveles de expresión. En contra de lo esperado, los niveles de TAD<sup>ER-DD</sup> en estas células sin Shield-1 analizados por WB eran inusualmente altos, y no sufrieron ningún incremento en presencia del ligando (figura 34, d). Para descartar que el DD introducido no fuera funcional, comprobamos que la quimera YFP-DD en efecto sufría un drástico aumento en presencia de Shield-1, si bien se apreciaba cierto nivel basal (figura 34, e). Decidimos sin embargo probar la funcionalidad del sistema examinando la fosforilación de H2AX. Sorprendentemente, si bien la adición de Shield-1 o 4OHT por separado no indujeron la actividad de ATR, detectamos una clara fosforilación cuando ambos compuestos estaban presentes (figura 35, a).

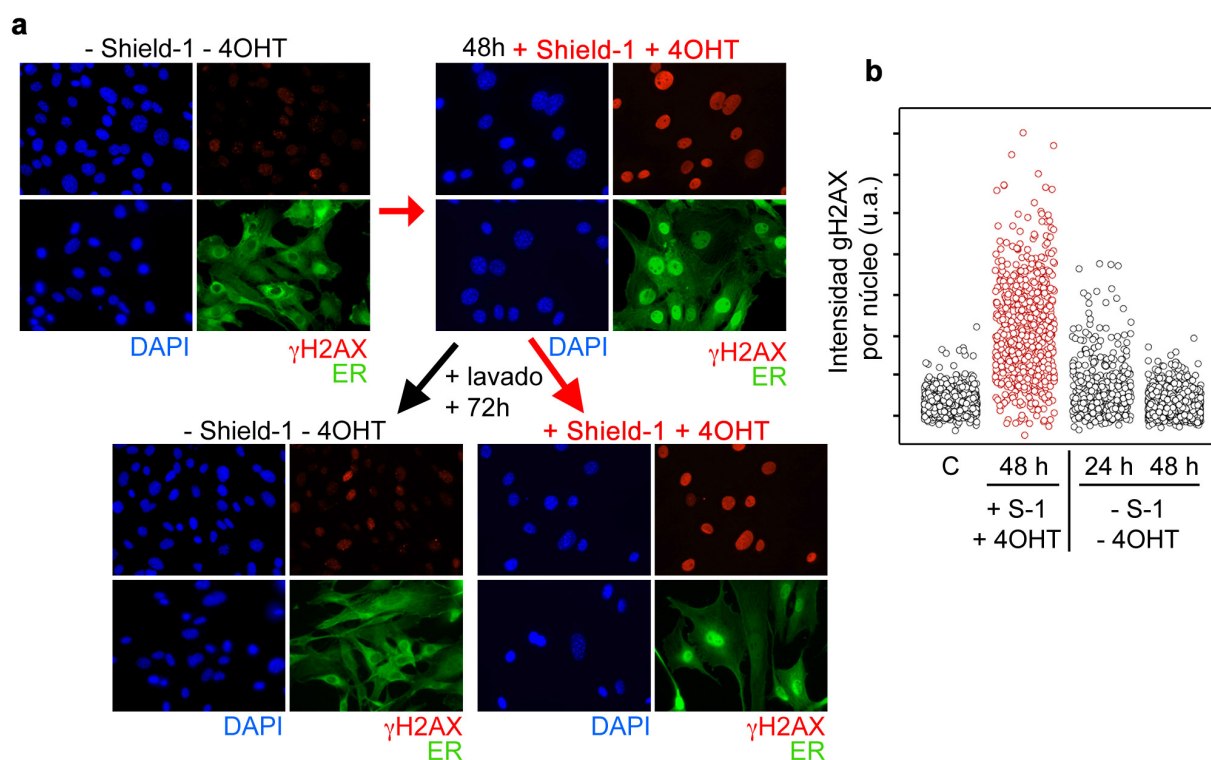


**Figura 35 | La combinación de Shield-1 y 4OHT activa el sistema y detiene la proliferación celular.**

**a**, Actividad de la quimera revelada por la fosforilación de H2AX sólo en presencia de Shield-1 y 4OHT. **b**, El sistema TAD<sup>ER-DD</sup> detiene la proliferación celular si se activa con Shield-1 y 4-OHT. Contaje de células 48 horas después de ser incubadas con los compuestos indicados. **c**, Imágenes de campo claro que muestran como retirando el Shield-1 y 4OHT las células vuelven a proliferar, mientras que en presencia de ambos se observan signos de senescencia.

Esta diferencia, sin embargo, no se debía al aumento de los niveles de la proteína. Una posibilidad a explorar sería si en ausencia de Shield-1 la quimera no tenía el apropiado plegamiento, resultando no funcional. En cualquier caso, dado que el sistema estaba induciendo claramente la actividad de ATR, aún sin saber la explicación, examinamos si era suficiente para incidir en la proliferación celular. Sólo combinando ambos compuestos observamos un significativo descenso en la proliferación 48 horas después, y comenzamos a apreciar la aparición de células morfológicamente senescentes (figura 35 b, c).

Basándonos en la observación de que el sistema estaba inactivo en ausencia de Shield-1 y 4OHT (S/O), dividimos estas células y analizamos su crecimiento en presencia o en ausencia de ambos compuestos (figura 35, c). Mientras que con S/O la entrada en senescencia se hizo evidente 72 horas más tarde, las células con medio fresco siguieron proliferando, sugiriendo que al contrario que  $TAD^{ER}$ , el sistema  $TAD^{ER-DD}$  era reversible. Confirmamos por inmunofluorescencia que efectivamente la quimera  $TAD^{ER-DD}$  se traslocaba al núcleo en presencia de S/O y se recolocaba en el citoplasma en ausencia de los ligandos (figura 36, a).

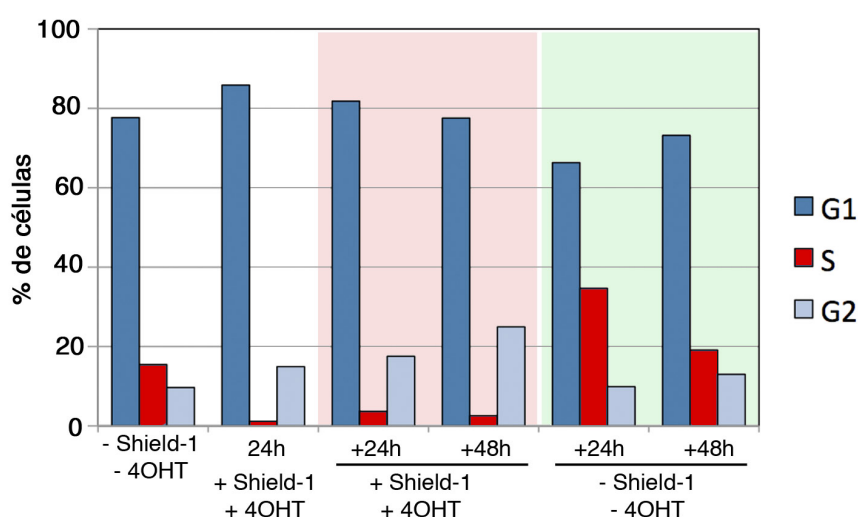


**Figura 36 | La translocación de  $TAD^{ER-DD}$  revierte y  $\gamma H2AX$  vuelve a los niveles basales. a,** Inmunofluorescencia que muestra la localización de la quimera  $TAD^{ER-DD}$  y la fosforilación de H2AX en células 3T3<sup>TER-DD</sup>. Las células fueron tratadas con Shield-1 y 4OHT durante 48 horas, lavadas, e incubadas de nuevo en presencia o ausencia de ambos compuestos durante 72 horas **b,** Datos de HTM de los niveles de  $\gamma H2AX$  en células tratadas como indica el apartado a.



Lo más llamativo fue observar que la fosforilación de H2AX revertía en ausencia de TAD<sup>ER-DD</sup> nuclear, aportando la evidencia molecular de que la reactivación de la proliferación era debida a una defosforilación como consecuencia del apagado de la señal. Comprobamos este dato por HTM y constatamos que se producía una disminución global de los niveles de  $\gamma$ H2AX (figura 36, b).

Este incremento en la proliferación sugería que las células estaban reentrando en el ciclo por la desactivación de los checkpoints. Para evaluar esta posibilidad analizamos la incorporación de BrdU en células que, después de haber estado 24 horas con S/O, se mantuvieron en cultivo en ausencia o en presencia de los ligandos. Observamos que mientras que en presencia constante de S/O se mantenía un claro checkpoint G1/S activo, las células reentraron en fase S al retirar los dos compuestos (figura 37). Por lo tanto, pudimos concluir que el sistema TAD<sup>ER-DD</sup> recapitulaba los efectos de la señal generada por TAD<sup>ER</sup>, y además de forma reversible.



**Figura 37 | El sistema TAD<sup>ER-DD</sup> induce un checkpoint reversible** Proporción de células en G1, S (BrdU positivas) y G2. Tras 24 horas con Shield-1 y 4OHT se midió la incorporación de BrdU. Después de estas 24 horas, las células se incubaron 24 y 48 horas con o sin los compuestos, analizándose de nuevo la incorporación de BrdU.

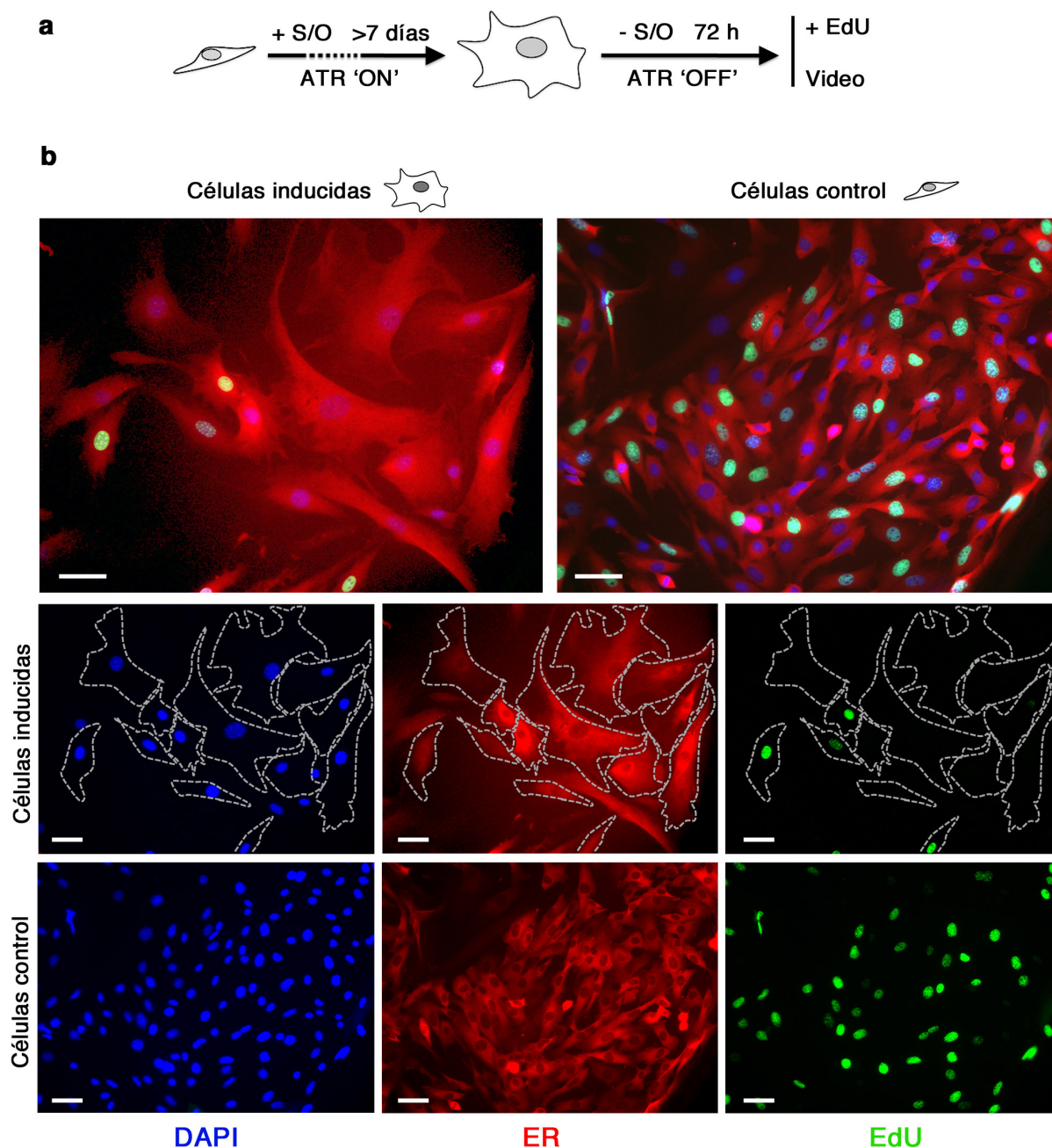
### 5.2.3. Evidencias sobre la no reversibilidad de la senescencia

Decidimos entonces abordar experimentalmente la reversibilidad de la senescencia. Siendo rigurosos con nuestra hipótesis (ver comienzo del capítulo), ensayos basados en medidas globales de proliferación podían llevar a conclusiones erróneas. También en nuestro sistema hemos observado que aparentemente no todas las células entran sincrónicamente en senescencia, por lo que incluso a tiempos largos de haber inducido la parada proliferativa no podíamos estar seguros de que todas las células fueran realmente senescentes. Así,

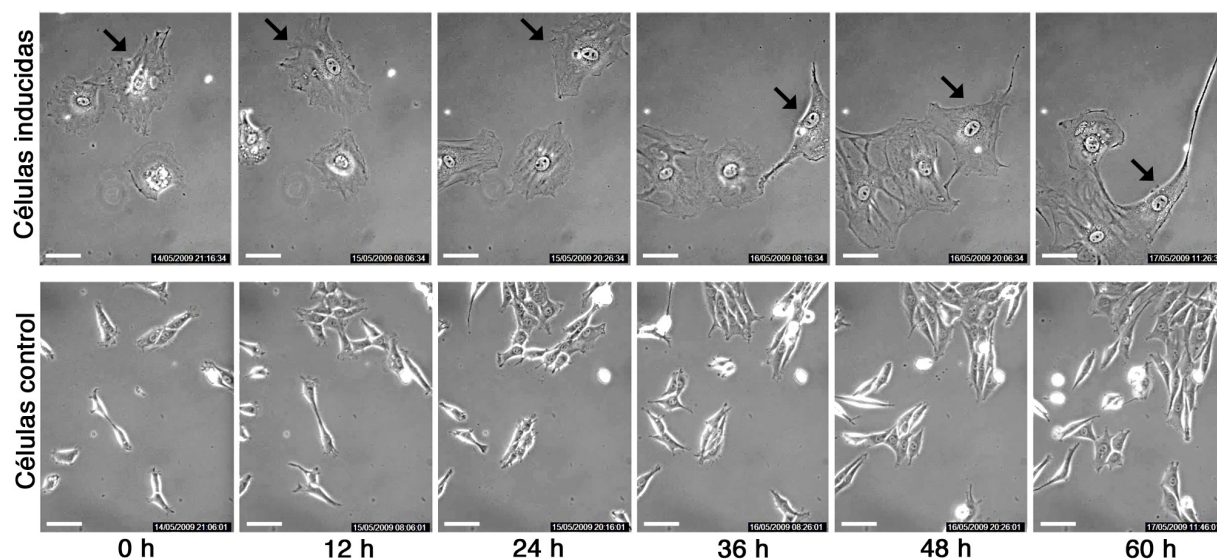
consideramos fundamental dirigir nuestros experimentos al análisis célula a célula, buscando identificar las células senescentes por su fenotipo morfológico. Utilizamos dos estrategias complementarias para visualizar la progresión del ciclo en células singulares. Examinamos la incorporación de EdU (análogo de BrdU) por inmunofluorescencia para detectar síntesis de ADN, y grabamos videos de células vivas para observar proliferación individualizada. Elegimos las condiciones experimentales en función de nuestros resultados previos. Indujimos la entrada en senescencia de células 3T3<sup>TER-DD</sup> un mínimo de 7 días con Shield-1 y 4OHT. Utilizamos el nivel de  $\gamma$ H2AX como indicador de actividad de ATR. Considerando que revierte a los niveles normales después de 48 horas sin Shield-1 y 4OHT (figura 36, b), establecimos un tiempo de 72 horas como el necesario para que la señal se apague completamente (sabemos que el sistema TAD<sup>ER-DD</sup> revierte en cuestión de minutos, pero no las fosforilaciones). Una vez pasado ese tiempo comenzamos nuestros ensayos. Incubamos las células con EdU durante 24 horas (tiempo suficiente para que todas las células de una población asincrónica control se marque), detectando posteriormente la incorporación célula a célula mediante fluorescencia en placa. Combinamos esta técnica con una tinción con el anticuerpo contra el ER tanto para detectar la localización celular de la quimera como para visualizar la morfología celular (la quimera se distribuye homogéneamente por el citoplasma en ausencia de Shield-1/4OHT). En paralelo realizamos tinciones para  $\gamma$ H2AX para confirmar que la fosforilación había revertido en el momento del ensayo. Alternativamente, grabamos videos capturando imágenes de células vivas de forma automatizada cada 10 minutos durante 60-70 horas.

Los resultados que hemos obtenido hasta la fecha son preliminares. Es necesario recabar más evidencias (mayor número de experimentos y a tiempos más largos) y realizar otro tipo de ensayos para poder llegar a una conclusión determinante. No obstante, nuestras observaciones hasta el momento apuntan a que la senescencia inducida en nuestro sistema no es reversible. Tanto la incorporación de EdU como la proliferación celular han sido extremadamente difíciles de detectar en células que por tamaño y morfología corresponden a un estado senescente. Sin embargo, sí ha sido fácil encontrar ambos fenómenos en células generalmente pequeñas y con una morfología más cercana a la de fibroblastos en proliferación. Como se muestra en la figura 38 (b), un alto porcentaje de células en proliferación incorpora EdU con sólo 4 horas de exposición. Sin embargo, sólo algunas células entre las más pequeñas y de morfología más distinta a la senescente incorporaron EdU en 24 horas de exposición después de revertir el sistema tras inducir la señalización de ATR durante una semana. En la figura 39 se muestra una serie de imágenes de un video en el que se puede observar cómo las células morfológicamente senescentes no se dividen en el transcurso de 60 horas, cuando la tasa de división de NIH3T3 es aproximadamente de 24 horas. En contraste, se ve cómo células sin

inducir se dividen rápidamente durante ese tiempo. Fue interesante además visualizar la gran actividad que manifestaron las células senescentes a pesar de no proliferar. La morfología de estas células está en constante cambio, lo que en algunos casos se traduce en una gran movilidad espacial (figura 39, flechas).



**Figura 38 | Síntesis de ADN en células de morfología no senescente. a,** Esquema del experimento. Después de un mínimo de 7 días con Shield-1 y 4OHT (S/O), se retiraron ambos compuestos durante 72 horas. Posteriormente las células se incubaron con Edu 24 horas (4 horas en el caso de células control) o se tomaron imágenes para componer los videos. **b,** Inmunofluorescencias de células inducidas (7 días +, 72 horas -) y células control, en el que se puede apreciar la síntesis de ADN en función de la morfología celular. La incorporación de EdU se detectó con un fluoróforo, combinando el protocolo con una tinción estándar con el anticuerpo contra ER para visualizar la localización de la quimera TAD<sup>ER-DD</sup>. En las imágenes de menor tamaño se delimita el contorno celular para diferenciar su morfología más fácilmente.



**Figura 39 | Proliferación en células senescentes por acción de TAD<sup>ER-DD</sup>.** Imágenes muestra de los vídeos realizados en células inducidas con el sistema TAD<sup>ER-DD</sup> durante 7 días, y en células control. Las flechas señalan el recorrido realizado por una de las células senescentes en el transcurso de las 60 horas de grabación.

Teniendo en consideración que disponemos únicamente de datos preliminares no podemos concluir formalmente que la senescencia inducida por una DDR persistente sea irreversible. No obstante, como planteamos en la discusión, si podemos afirmar que las evidencias recabadas hasta ahora podrían apuntar en esa dirección.

### 5.3. ¿Puede utilizarse ATR como diana terapéutica contra el cáncer?

Como ya en su día expusiera Paul Ehrlich (Strebhardt and Ullrich, 2008), la terapia contra el cáncer persigue la búsqueda de la “bala mágica” que selectivamente ataque y elimine las células cancerosas. *Grosso modo*, este objetivo se puede alcanzar a nivel práctico mediante dos estrategias alternativas. La más fiel al concepto de Ehrlich persigue el diseño de métodos de administración dirigidos estrictamente a células cancerosas, haciendo uso de marcadores específicos que pueden servir de diana, por ejemplo, de anticuerpos monoclonales. Sin embargo, la metodología ampliamente desarrollada está basada en el uso de quimioterapia que ataque y elimine preferencialmente las células tumorales en función de sus características y debilidades particulares. Esta estrategia es especialmente eficaz si se introduce el fenómeno de la letalidad sintética, que busca aprovechar las limitaciones de las células cancerosas para sobrevivir si se atacan o inhiben conjuntamente procesos fundamentales, como pueden ser la



replicación y la reparación del ADN (O'Connor et al., 2007). En concreto, ATR y Chk1 son dos quinasas cuya inhibición puede suponer una “bala mágica” contra las células tumorales.

La falta tanto de ATR como de Chk1 provoca letalidad embrionaria temprana (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000). Especialmente en el caso de ATR, su función en el control del estrés replicativo resulta tan esencial que las células no sobreviven siquiera a una ronda de replicación (Brown and Baltimore, 2000; Cortez et al., 2001). Recientemente en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto el papel fundamental de ATR para la fisiología celular con un modelo humanizado de ratón para el síndrome de Seckel (Murga et al., 2009). Las células hipomorfas para ATR (con un 5% de los niveles normales) acumulan gran cantidad de estrés replicativo, lo que compromete su viabilidad y acelera el envejecimiento del ratón. Se esperaba que esta severidad fuera rescatada por la ausencia de p53 pero, sin embargo, se agravó de forma generalizada. La función de ATR es tan fundamental para la célula que en ausencia de p53 la viabilidad es incluso menor debido a un mayor estrés replicativo, fruto de que las células p53<sup>-/-</sup> proliferan ligeramente más rápido. En otras palabras, este resultado demostraba que niveles extremadamente bajos de actividad ATR eran letales para las células p53<sup>-/-</sup> porque replican más deprisa, lo que supone un caso de letalidad sintética. Por otro lado se sabe que inhibir la vía de ATR a través de Chk1 sensibiliza específicamente a células deficientes en p53 al inhabilitar el checkpoint G2/M (Wang et al., 1996). Inhibidores de Chk1 como UCN-01 (Busby et al., 2000) ya se están testando en ensayos clínicos (Lapenna and Giordano, 2009) aprovechando esta facultad. Un inhibidor de ATR podría combinar sinérgicamente ambos efectos letales. Dado el jerárquico control de ATR sobre Chk1, un potencial inhibidor desactivaría igualmente el checkpoint G2/M, a la par que causaría niveles intolerables de estrés replicativo en células con altas tasas de replicación, como las tumorales. De hecho, existen experimentos genéticos que muestran como la inactivación de ATR sensibiliza a células con un checkpoint G1/S disfuncional (Nghiem et al., 2001), debido al efecto combinado de la ausencia de p53 y ATR sobre el checkpoint G2/M (Nghiem et al., 2002). Se podría especular así que la falta de p53, mutado o delecionado en más de un 50% de los cánceres humanos, sería una ventaja más que una adversidad en una terapia combinada con inhibidores de ATR.

### **5.3.1. Diseño de un screening de inhibidores de ATR**

Los pocos inhibidores de ATR conocidos, como cafeína y wortmannina tienen limitada efectividad y son de uso estrictamente en cultivo. Además, ambos inhiben con igual o incluso mayor eficacia a ATM (Sarkaria et al., 1999; Sarkaria et al., 1998). Un compuesto natural,

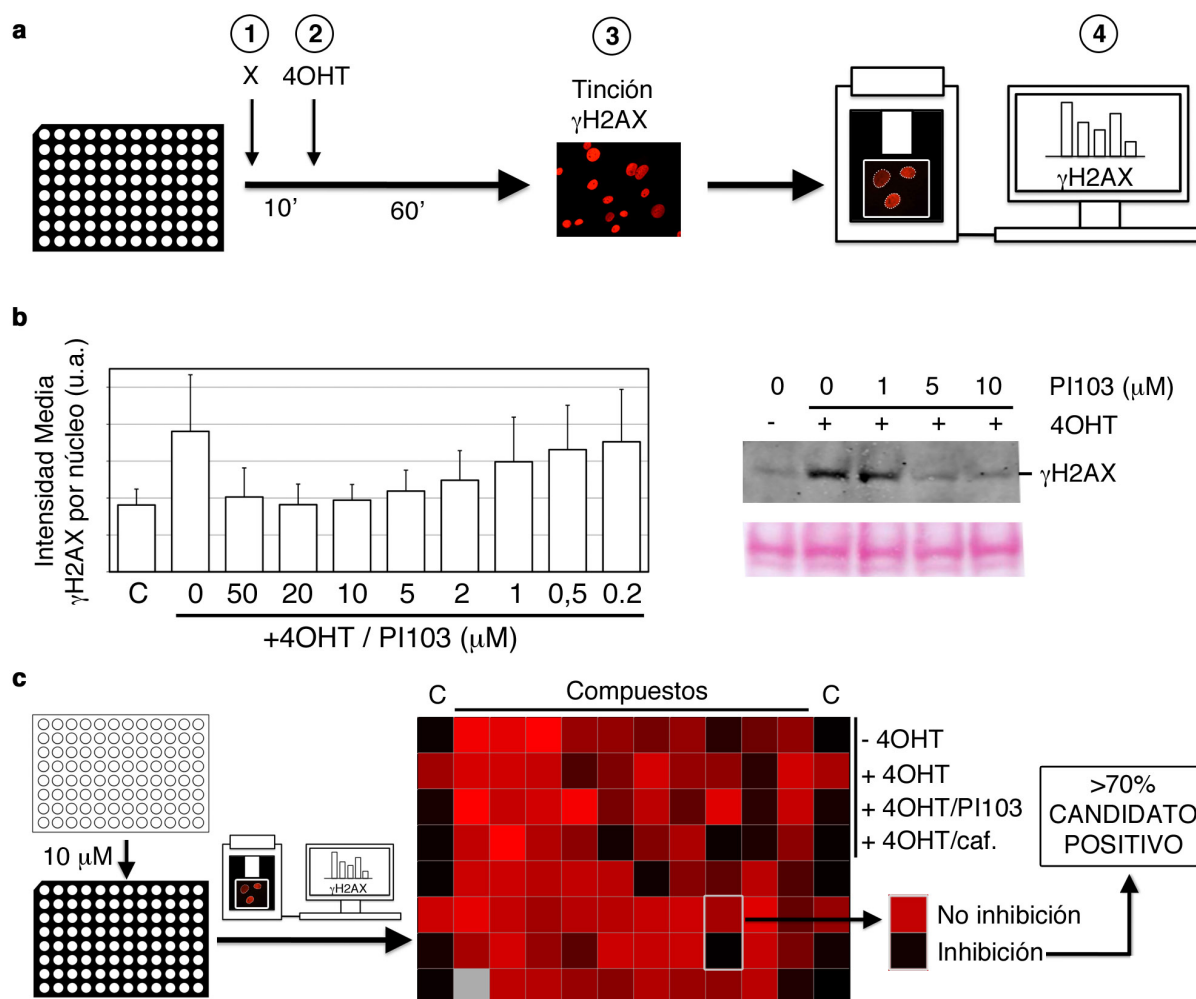
*schisandrin B*, ha sido recientemente identificado como un inhibidor de ATR ( $IC_{50} = 7.25 \mu M$  *in vitro*) y ATM ( $IC_{50} = 1.74 mM$ ), aunque estos resultados no han podido ser contrastados por otros grupos todavía (Nishida et al., 2009). El desarrollo de rastreos masivos de bibliotecas o *screenings* ha permitido indentificar inhibidores altamente eficaces y específicos para otras PIKKs, como DNA-PKcs y ATM (Hickson et al., 2004; Leahy et al., 2004). Sin embargo, en el caso de ATR no se ha podido llevar a cabo un *screening* con éxito hasta la fecha debido a diversas limitaciones. Por un lado es previsible que la metodología *in vitro* utilizada para ATM (Hickson et al., 2004) sea difícil de trasladar a ATR, ya que la necesaria presencia de ATRIP y TopBP1 para activar la enzima *in vitro* complicaría seriamente el desarrollo del ensayo (Choi et al., 2007; Kumagai et al., 2006). Por otro lado, para un análisis a gran escala en células sería necesario utilizar agentes genotóxicos dependientes de replicación para tener un indicador de actividad de ATR. Así planteado, un compuesto identificado como positivo podría resultar ser simplemente un inhibidor de la replicación, impidiendo que el genotóxico perturbe las horquillas. Además, podría especularse que en determinadas circunstancias, el uso combinado de un potencial inhibidor de ATR y un genotóxico podría en el fondo generar mucho más daño, enmascarando la señal.

Así, consideramos que el sistema TADER podría utilizarse para un *screening* de inhibidores de ATR sin las limitaciones descritas anteriormente. Las razones serían las siguientes:

- No es necesario el uso de agentes genotóxicos.
- La adición al medio de 4OHT induce una rápida, específica y generalizada activación de ATR.
- La medición de la actividad de ATR es fácil y reproducible a través de la intensidad de  $\gamma H2AX$  por inmunofluorescencia.
- El ensayo se puede realizar y analizar de forma automatizada en placas de 96 o 384 pocillos, posibilitando el rastreo masivo de librerías.

En base a los resultados descritos con anterioridad en esta tesis, diseñamos un ensayo estandarizado para medir la actividad de ATR basada en la intensidad de  $\gamma H2AX$ . El protocolo quedó definido en los siguientes pasos (figura 40, a):

1. Adición de los compuestos (10 minutos de preincubación).
2. Adición de 4OHT (1 hora de incubación).
3. Tinción de  $\gamma H2AX$  por inmunofluorescencia.
4. Lectura de intensidades por HTM y análisis de datos.



**Figura 40 | Screening de inhibidores de ATR.** **a**, Metodología del ensayo (ver texto). Para más detalles ver materiales y metodos (HTM) **b**, Resultados obtenidos para PI103 (inhibidor de PI3K). Se muestra la intensidad de  $\gamma$ H2AX obtenida por inmunofluorescencia y por western blotting. **c**, Esquema experimental del screening de compuestos. Se utilizaron a una concentración 10  $\mu$ M. Después de ser leídos los valores de  $\gamma$ H2AX por HTM se obtienen diagramas de intensidades medias que permiten identificar los candidatos intuitivamente. Los controles (C) se añadieron en cada placa por cuadruplicado. Posteriormente se analizaron los valores numéricos de intensidades, estableciéndose en un 70% el valor mínimo de inhibición (intensidad de  $\gamma$ H2AX respecto al 100% +4OHT/-4OHT) para considerarse un candidato como positivo.

En primer lugar pusimos a punto la técnica. En diversas pruebas preliminares establecimos la reproducibilidad del ensayo y definimos la cafeína (5 mM) como control positivo de inhibición. Seguidamente, analizamos diversos compuestos facilitados por la Sección de Cribado de Alto Rendimiento del programa de Terapias Experimentales en el CNIO. Estos compuestos fueron seleccionados por su actividad inhibidora de PI3-quinasa. Entre diferentes PIKKs o incluso con PI3K los inhibidores conocidos presentan siempre cierto nivel de actividad, aunque la especificidad viene definida por las claras diferencias en  $IC_{50}$ . Así, realizando un ensayo previo a una concentración 10  $\mu$ M, detectamos una clara actividad del compuesto PI103, previamente

publicado como inhibidor de diferentes isoformas de PI3K y con cierta capacidad inhibitoria de TORC1 (mTOR) y DNA-PK (Raynaud et al., 2007). Como control adicional comprobamos que en ninguno de los casos la inhibición se debía a un efecto antagonista frente al 4OHT que impidiera a la quimera TAD<sup>ER</sup> translocarse al núcleo. Realizamos una curva dosis-respuesta para PI103 que demostraba el efecto inhibidor progresivo del compuesto y comprobamos mediante WB los mismos resultados (figura 40, b). Decidimos a partir de entonces incluir este compuesto en nuestros ensayos como control positivo de inhibición (10  $\mu$ M) junto a la cafeína.

### 5.3.2. Identificación de inhibidores potenciales de ATR

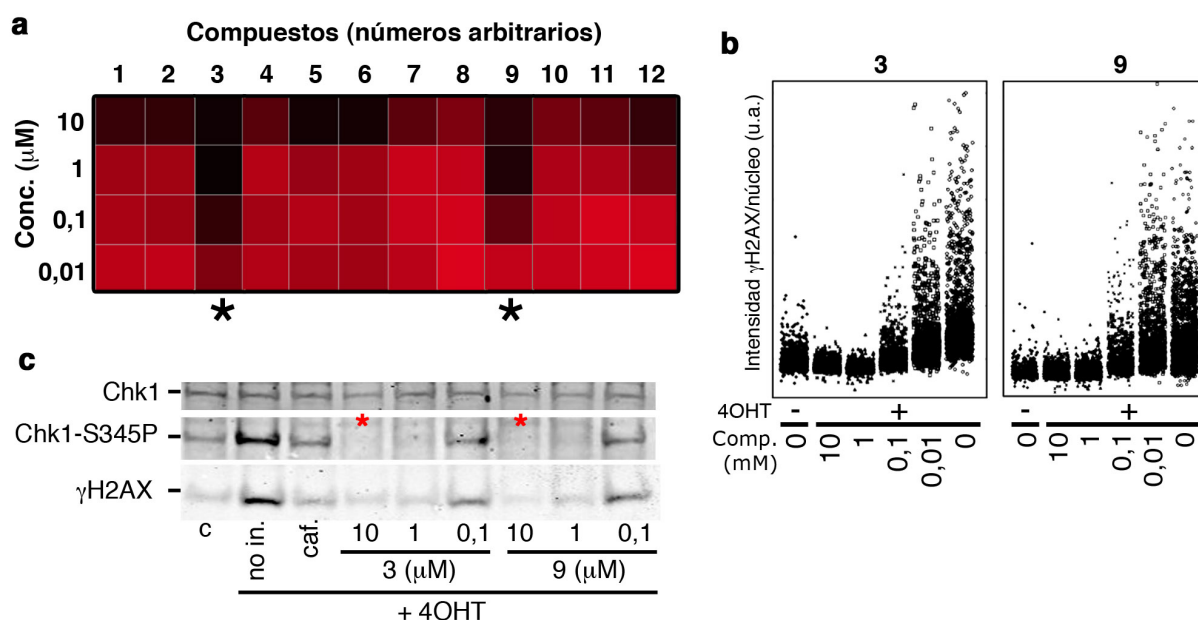
Una vez establecida la fiabilidad y reproducibilidad del método pasamos a trabajar con librerías de compuestos adquiridas por el programa de Terapias Experimentales. Aquí se presentan los resultados preliminares del proyecto, ya que está actualmente en pleno desarrollo.

Comenzamos testando prioritariamente compuestos que por análisis computerizado se presentaban como potenciales inhibidores de PIKKs. El primer *screening* se realizó por duplicado, y comprendió el análisis de 160 compuestos a una concentración estándar de 10  $\mu$ M (figura 40, c). Para cada ensayo utilizamos cuatro controles internos por cuadruplicado: células sin 4OHT (representaba la línea base), células sólo con 4OHT (representaba el máximo de actividad), y dos controles de inhibición, 4OHT más PI103 (10  $\mu$ M) y 4OHT más cafeína (5mM). El análisis automatizado de las placas nos permitía visualizar rápidamente el resultado. Se extrajeron y compararon los valores medios de intensidad por pocillo respecto a la línea base y al máximo de actividad, y establecimos un punto de corte eligiendo como positivos compuestos que mostraron como mínimo una actividad inhibidora del 70%. Encontramos un total de 14 compuestos entre los 160 que reducían a menos de un 30% la intensidad de  $\gamma$ H2AX respecto al máximo. Se comprobó para cada positivo que esta reducción no se debía a posible toxicidad, analizando la morfología celular y nuclear de las células tratadas en las placas originales.

Posteriormente, se llevaron a cabo análisis computerizados en la Sección de Cribado de Alto Rendimiento en base a cálculos estructurales para determinar posibles modificaciones de estos primeros candidatos que aumentaran su efectividad frente a PIKKs. De esta forma se seleccionaron 160 nuevos compuestos de la librería y se testaron siguiendo el mismo procedimiento. Se obtuvieron 16 nuevos candidatos, que sumados a los identificados en el primer *screening* hacían un total de 30 compuestos.



Seguidamente llevamos a cabo ensayos de inhibición con estos 30 compuestos a concentraciones gradualmente decrecientes, con el fin de identificar aquellos que tuvieran actividad idealmente en el orden nanomolar. Dos de los compuestos se destacaron claramente del resto, manifestando una relativa capacidad inhibidora del sistema a una concentración 100 nM (figura 41, a, b). Reproducimos estos resultados por WB, analizando la fosforilación de Chk1 (S345) y de H2AX. Ambas fosforilaciones se redujeron con ambos compuestos incluso a una concentración 100 nM (figura 41, c). Fue llamativo revelar que a concentraciones altas (10 y 1 micromolar) desapareció también la fosforilación basal de Chk1, indicando que ambos compuestos son capaces de inhibir completamente la actividad de ATR, incluso por encima de la estimulación ejercida por TAD.



**Figura 41 | Ensayos de inhibición a diferentes concentraciones.** **a**, Se muestran los diagramas de intensidades medias de  $\gamma$ H2AX obtenidos para 12 de los 30 compuestos identificados. Se utilizaron diluciones seriadas de cada compuesto, destacándose 2 con actividad inhibidora en el rango nanomolar (3 y 9). **b**, Representando los valores individuales de intensidad de  $\gamma$ H2AX por núcleo se visualiza más en detalle la actividad inhibidora de los compuestos 3 y 9. **c**, Por western blotting se confirma la inhibición de ATR examinando la fosforilación específica de Chk1. Los asteriscos señalan cómo los niveles basales de Chk1 (comparados al control) son también eliminados por los compuestos a 10 y 1  $\mu$ M.

La estrategia a seguir se dividió en este punto en dos vías paralelas. Por un lado vamos a continuar testando nuevos compuestos tanto de forma selectiva como a gran escala entre librerías de moléculas de actividad desconocida. Por otro lado es necesario profundizar en el análisis funcional de los candidatos identificados más prometedores:

- Estudios de especificidad frente a otras PIKKs.

Definir la especificidad del compuesto frente a otras enzimas homólogas es básico tanto para su uso en investigación como para la futura aplicación en terapias combinadas. En el laboratorio podemos llevar a cabo fácilmente ensayos de actividad frente a ATM, analizando la fosforilación específica de Chk2 (treonina 68) en respuesta a IR.

- Potencial inhibidor a nivel fisiológico.

Es necesario comprobar la actividad de cada compuesto en respuesta a eventos fisiológicos, verificando si la inhibición de ATR es tan eficiente como en el sistema TAD. Para ello comenzaremos analizando el efecto sobre la fosforilación de Chk1 en respuesta a agentes genotóxicos, así como ensayos para medir el estrés replicativo. Además, examinaremos la letalidad sintética en células p53<sup>-/-</sup> y el potencial inhibidor del checkpoint G2/M en respuesta a radiación ionizante.

**DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

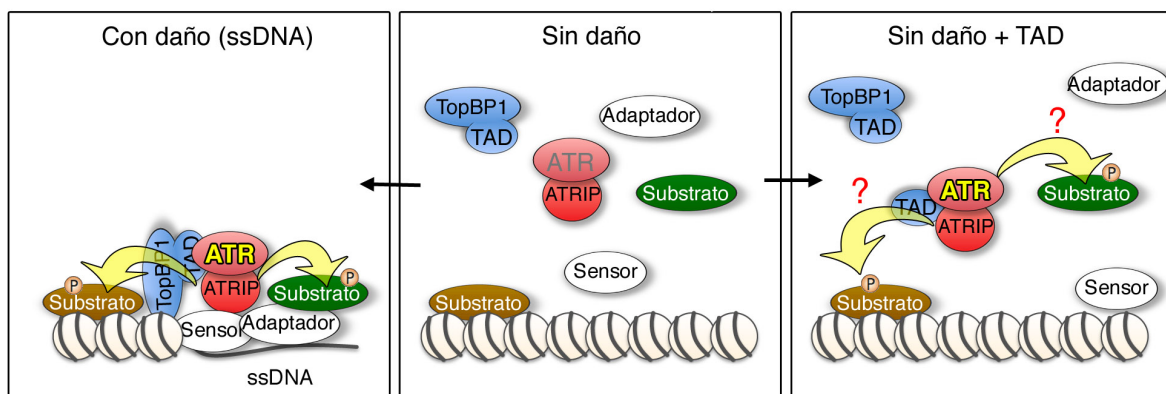
Con este trabajo hemos querido revisar aspectos elementales de la señalización del daño en el ADN, desde la base mecanística de su activación hasta las consecuencias funcionales que ésta puede tener para la célula. Al excluir el uso de agentes genotóxicos como fuente de activación de la respuesta al daño hemos planteado un enfoque alternativo a la visión canónica de la DDR. Hemos comprobado que no es necesario generar daño o estrés en el ADN para estimular catalíticamente la actividad de ATR, lo que nos ha brindado la oportunidad de evaluar cuál es el verdadero papel de la señalización atribuida a las quinasas de la DDR en los procesos celulares que se desencadenan en respuesta al daño genómico. El uso de un sistema molecular inducible nos ha permitido además explorar qué consecuencias fisiológicas tiene activar ATR tanto puntualmente como de manera persistente. En las primeras horas se observa el bloqueo clásico de la progresión del ciclo celular asociado a la activación de los checkpoints. Cuando la señalización se mantiene, el arresto persistente provoca una entrada prematura en senescencia. De esta forma hemos aportado nuevas evidencias del papel de ATR en el control del ciclo celular, y de la capacidad potencial de la DDR para inducir respuestas anti-tumorales.

Desde el funcionamiento del sistema inducible hasta las consecuencias últimas de la activación de ATR, nuestros resultados unas veces aportan luz y otras entran en conflicto con el conocimiento actual de la DDR y su implicación en la supresión tumoral. Principalmente por tratarse de un método artificial de activar una señal de daño, tanto sus limitaciones como sus capacidades deben ser contrastadas en el contexto adecuado.

### 1. Es posible activar la DDR sin el uso de agentes genotóxicos en células de mamífero

Hoy en día se tiene un amplio conocimiento sobre los mecanismos que gobiernan las cascadas de señalización celular y el fundamento de las modificaciones postraduccionales como interruptores que activan o desactivan complejos enzimáticos. En el caso de las quinasas de respuesta al daño era imaginable que, si se reproduce de una forma ectópica la modificación o cambio conformacional que es responsable de su activación, se podría controlar artificialmente su actividad catalítica. De hecho existen evidencias de alteraciones artificiales introducidas en la secuencia de proteínas o enzimas que modifican su actividad, comportamiento o estabilidad.

Tal es el caso de fosforilaciones en residuos serina, tirosina o treonina, que pueden mimetizarse substituyendo el aminoácido por un grupo ácido como aspártico o glutámico. Estas modificaciones, en algunos casos, consiguen recapitular el efecto de la modificación en ausencia del estímulo inicial que lo provoca. En el caso de las quinasas de daño esta estrategia es más compleja ya que tanto su actividad intrínseca como su funcionalidad dependen de múltiples interacciones con otros factores, siendo la colocación de todas estas proteínas un requisito para la efectividad de la señal (Wood and Chen, 2008). En otras palabras, no sólo es necesario activar la enzima, sino que es esencial que sea reclutada al lugar preciso donde otros adaptadores permiten que la quinasa y el sustrato se encuentren, de forma que la señal sea eficientemente transmitida (Discusión, figura 1). Tal es el caso de los defectos de señalización observados en ausencia de factores esenciales (o de su función) en la formación de focos o IRIF, como MDC1, H2AX o Nbs1, aún cuando ATM es capaz de activarse en respuesta a diferentes agentes genotóxicos (Celeste et al., 2002; Difilippantonio et al., 2005; Lou et al., 2006). En estos casos la incapacidad de ser reclutada a los sitios de daño influye incluso en su nivel máximo de activación, apoyando la importancia crucial de la colocación en procesos regulados de transmisión de señal. Por otro lado es lógico que los eventos necesarios para activar eficientemente la señal estén íntimamente ligados a la zona colindante de las lesiones, de forma que la probabilidad de una activación estocástica sea nula. La contrapartida a este requisito es que la señal generada por un único DSB debe en potencia ser suficiente para detener el ciclo en caso de que no pueda repararse con celeridad, por lo que el mecanismo de amplificación es fundamental.



**Discusión Figura 1 | Modelo de posible actividad del complejo ATR/ATRIP.** Mientras que en situaciones normales la concentración de factores promueve tanto la activación de ATR como su acceso a sustratos, con TAD no se podía asegurar a priori que, a pesar de activarse (hipotéticamente), pudiera alcanzar y fosforilar a los mismos dianas.

Todas estas circunstancias hacían pensar que activar eficientemente las quinasas de daño endógenas en ausencia de lesiones implicaría ser capaces de reproducir la concentración de

factores que tiene lugar en las lesiones. Así, otros grupos idearon la forma de conseguir la activación sin daño de ATM y Mec1 (ATR en *S. cerevisiae*) haciendo localizar artificialmente los factores necesarios en un punto preciso del genoma (Bonilla et al., 2008; Soutoglou and Misteli, 2008). Estos resultados confirmaban el modelo mecanístico de activación establecido para ambas quinasas, y al igual que los datos presentados en esta tesis, demostraban cómo incluso en ausencia de daño es posible que disparar los checkpoints.

No obstante, al igual que en estos trabajos se enfatiza que las dependencias estéricas y de colocalización son esenciales para activar a ATM y a ATR, nosotros tratamos de explicar por qué en nuestro caso no lo son.

## 2. El complejo ATR/ATRIP activado por TAD fosforila a sus substratos fundamentales en ausencia de daño

La posibilidad de activar ATR artificialmente se basaba en el hecho de que, independientemente de otros factores necesarios para la modulación y transmisión de la señal, la interacción física con un fragmento de TopBP1 era suficiente para estimularla catalíticamente *in vitro* (Kumagai et al., 2006). Este fragmento (a.a. 978 – 1286) no contiene ninguno de los BRCT u otros dominios de interacción/regulación de la proteína endógena, por lo que era posible que en el medio nucleoplásmico se comportara como en un ensayo *in vitro*, donde la concentración es el único factor determinante para cualquier reacción o interacción química. Nuestra hipótesis era que si la interacción con el fragmento se daba con suficiente eficiencia sería posible activar a ATR estocásticamente, aunque no podíamos predecir si esta activación sería suficiente para que ATR pudiera físicamente alcanzar sus substratos en ausencia de daño. Esta posibilidad podía limitar considerablemente la funcionalidad del sistema, por lo que es un aspecto que siempre hemos tenido en mente a la hora de valorar nuestros resultados.

Tras comprobar que efectivamente el TAD activa a ATR en células de mamífero, fuimos sumando observaciones que apoyaban la hipótesis de que el mecanismo por el cual ambas proteínas interaccionaban era un fenómeno puramente aleatorio. En primer lugar, el patrón de  $\gamma$ H2AX observado en inmunofluorescencia (figuras 5, 6, 8, 9 y 20) responde a un fenómeno de fosforilación difuso. Como toda histona, la movilidad nuclear de H2AX es prácticamente nula al estar formando parte de los nucleosomas, por lo que necesariamente la quinasa responsable tiene que tener movilidad. De hecho, en las zonas claramente heterocromatínicas de los



fibroblastos murinos, visibles simplemente por tinción con DAPI, la fosforilación de H2AX en respuesta a TAD es en muchos casos menor, indicando que el complejo ATR/ATRIP es capaz de alcanzar a H2AX preferencialmente en áreas de eucromatina, más accesibles estéricamente.

La relación entre los niveles de expresión de TAD y la actividad catalítica de ATR (figura 5) que hemos observado en todos los procesos celulares analizados reproduce las observaciones realizadas *in vitro*. Este comportamiento corrobora la visión de TopBP1 como un activador alostérico de ATR, de forma que la interacción física entre ambas proteínas debe ocurrir para provocar un hipotético cambio conformacional que dispare la capacidad quinasa. Por tanto mayores niveles de TAD nucleares, en ausencia de otras regulaciones, tienen más efecto sobre la actividad de ATR. Desde este punto de vista, las dificultades encontradas para alcanzar los niveles óptimos de expresión de TAD en células, a pesar de haber utilizado métodos de transducción génica altamente eficientes, sugieren que la eficiencia de la interacción es inusualmente pobre. Sin embargo, si ATR y TAD tuvieran mucha afinidad electrostática, considerando que otras interacciones no lo dificultaran, cada copia de TAD acabaría uniéndose a una molécula de ATR si fuera sobreexpresado. De hecho, en un primer momento hipotetizamos que, al carecer del resto de dominios reguladores de TopBP1, el pequeño dominio TAD sería muy eficiente activando ATR. Sin embargo, tiene sentido pensar que la estimulación por TopBP1 estaría fuera de control si su afinidad con ATR fuera fuerte. De este modo, una interacción lábil pero estéricamente efectiva permite a la célula activar a ATR sólo cuando otros adaptadores colocan a ambas proteínas extremadamente cerca una de la otra en las zonas de ssDNA (Delacroix et al., 2007; Lee et al., 2007; Xu et al., 2008). Por esta razón ha sido difícil encontrar una forma activa de ATR en inmunoprecipitados de células tratadas con agentes genotóxicos (Abraham, 2001). En cambio, ATM preactivada y precipitada se ha venido usando durante años en ensayos *in vitro*, sugiriendo que en este caso el cambio conformacional responsable de su actividad no sería inducido por interacciones lábiles con otros factores que se perderían en el ensayo, sino por una o varias modificaciones postraduccionales (Bakkenist and Kastan, 2003; Canman et al., 1998).

A pesar de estas limitaciones hemos demostrado que es posible superar el umbral necesario para activar a ATR de forma efectiva mediante la expresión de TAD, pero también hemos observado que este umbral es distinto para fosforilar diferentes sustratos. Esperábamos que, al tratarse de un sistema artificial, los mecanismos endógenos que regulan el acceso de ATR a unas u otras de sus dianas fueran irrelevantes, pudiéndose desencadenar una señal global. La primera evidencia de que el sistema funcionaba la obtuvimos al detectar la fosforilación de H2AX, a la que siguieron las de Rad17 y Smc1. Nuestro objetivo fundamental, como prueba

esencial de la actividad de ATR y como requisito para que el sistema fuera capaz de inducir ciertas respuestas fisiológicas, era detectar la fosforilación de Chk1. Sin embargo no fuimos capaces de detectarla en MEF, a pesar de observar una clara inducción de los checkpoints y la entrada en senescencia. Sólo cuando el sistema se expresó eficientemente en líneas inmortales pudimos revelar una clara fosforilación de Chk1 en respuesta a TAD. Hasta ese momento, teniendo en cuenta nuestras propias reservas acerca de cuáles serían las capacidades del complejo ATR/ATRIP activado ectópicamente, consideramos incluso que molecularmente no era posible alcanzar a Chk1, ya que era un sustrato con una diferencia fundamental a los otros observados previamente. Mientras que H2AX (como histona), Rad17 y Smc1 son proteínas funcionalmente ligadas a la cromatina (Yazdi, 2002; Zou, 2002), Chk1, como quinasa efectora de la parada del ciclo, es altamente móvil. Esta característica podía estar reduciendo la probabilidad de que el complejo ATR/ATRIP colisionara aleatoriamente con Chk1, mientras que los demás sustratos podían ser fosforilados más fácilmente al encontrarse fijados en la cromatina. Sin embargo una gran parte del total de Chk1 está unida a la cromatina en ausencia de daño (Smits et al., 2006), lo que indicaba que otro factor adicional podía estar imposibilitando que pudiéramos detectar su fosforilación. El candidato más probable es Claspin, ya que su mediación es necesaria para que ATR fosforile a Chk1 (Liu et al., 2006a). Mecánicamente tiene sentido que la necesidad de una segunda interacción hipotéticamente estocástica reduzca las probabilidades de que se produzca la reacción. Curiosamente, en el trabajo de *Liu et al.* se demuestra que Claspin es necesario sólo para que ATR fosforile a Chk1 y no a otros sustratos (TopBP1 es necesario para todos), destacando precisamente, además de Nbs1, a H2AX, Smc1 y Rad17 (la fosforilación de Rad17 es un dato confirmado por el laboratorio). Ya que no se sabe si en respuesta a daño Claspin sirve simplemente de puente entre ATR y Chk1 o si es necesario estéricamente para que se produzca la fosforilación, no podemos descartar que fuera irrelevante en el caso de activar ATR artificialmente. En otras palabras, no sabemos si, aún pre-activada por TAD y difundiendo por el núcleo, ATR necesita a Claspin para ser capaz de fosforilar a Chk1, o si puede alcanzar directamente a Chk1 y la eficiencia responde simplemente a una cuestión aleatoria. Nuestro sistema podría servir de modelo para responder a esta pregunta.

En definitiva, la ruta de señalización de ATR-(Claspin)-Chk1 funciona de forma basal en condiciones normales (sin daño), y es responsable del correcto transcurso de la replicación (Petermann and Caldecott, 2006). De esta forma, TAD podría estar estimulando ectópicamente una ruta preexistente al interaccionar aleatoriamente con ATR, haciendo que aumente su señal en órdenes de magnitud y se activen los checkpoints en ausencia de daño. Así, los niveles extra de TAD necesarios para detectar la fosforilación de Chk1 podrían deberse

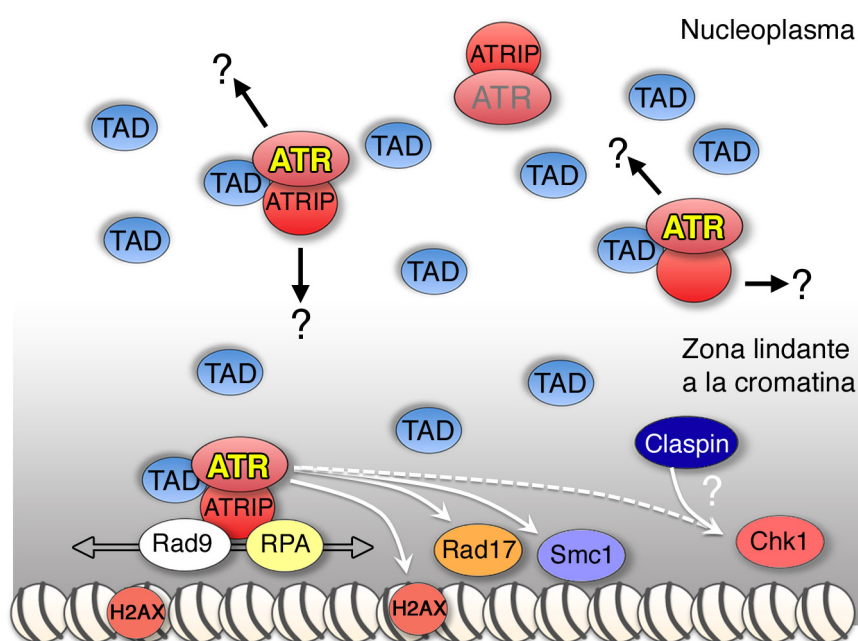
a que sólo un porcentaje de ATR está en posición de interactuar con Chk1 en condiciones normales.

A pesar de demostrar que la expresión de TAD es suficiente para que ATR fosforile diversos sustratos, con la dificultad añadida de alcanzar Chk1, no hemos podido observar un fenómeno como la monoubiquitinación de FANCD2, dependiente de la actividad de ATR. Si bien es cierto que no comprobamos si efectivamente FANCD2 estaba siendo fosforilado en nuestras células (por la falta de anticuerpos específicos), es poco plausible que un proceso que requiere la intervención de otros complejos enzimáticos pudiera tener lugar de forma ectópica. La concentración eficiente de estos complejos sólo tendría lugar en las lesiones, de forma que, si bien la fosforilación por ATR es un requisito, no sería suficiente para reproducir fuera de los sitios de daño la colocalización de los diferentes factores necesarios para ubiquitinar FANCD2.

En vista de un mecanismo de actuación difuso y estocástico del trío ATR/ATRIP/TAD, los resultados de la figura 17 son, como poco, intrigantes. Indican que, incluso siendo activada artificialmente, ATR necesita, además de ATRIP (que forma un complejo funcional con ATR) a RPA y Rad9 para fosforilar sus sustratos. Como se comentaba previamente, esta observación podría armonizar con la fosforilación de Chk1 como consecuencia de la sobreactivación de una vía que funciona endógenamente de forma basal, ya que en este caso tanto Rad9 como RPA serían requeridos. Sin embargo, mientras que Chk1 podría ser fosforilado allá donde hipotéticamente los complejos con ATR están formados y después difundir, no encaja con que ATR sea capaz de fosforilar a H2AX por todo el núcleo. Una posibilidad sería que en células de mamífero Rad9 y RPA formaran un complejo con ATR-ATRIP en ausencia de daño, y que esas interacciones fueran necesarias para su actividad catalítica. Sin embargo nos inclinamos por la otra opción determinante para que ATR sea funcional, y es que Rad9 y RPA tengan un papel esencial en localizar a ATR lo suficientemente cerca de sus sustratos como para que la fosforilación pueda tener lugar (Discusión, figura 2).

El modelo actual de activación de ATR sugiere que ATRIP y Rad9 interactúan por un lado con RPA en las zonas de ssDNA (Ball et al., 2005; Xu et al., 2008), y por otro con ATR y TopBP1 respectivamente (Delacroix et al., 2007; Lee et al., 2007; Mordes et al., 2008a; Yan and Michael, 2009), haciendo que el TAD y el dominio PRD de ATR contacten y se produzca la estimulación alostérica. TopBP1 es reclutada a través de sus dominios BRCT 1 y 2 por Rad9 mientras que el otro extremo de la proteína interactúa con ATR. En función de nuestros primeros resultados podíamos especular que RPA y Rad9 fueran irrelevantes para ATR activada por TAD. Sin embargo el aparente requerimiento de Rad9 planteaba la posibilidad de

que su interacción con el complejo fuera necesaria para reclutar a ATR. Otra opción, aunque menos plausible es que Rad9 fuera necesario para dotar a ATR de actividad catalítica en células de mamífero, ya que en *S. cerevisiae* el homólogo del complejo Rad9-Hus1-Rad1 es un coactivador de ATR (Navadgi-Patil and Burgers, 2008). En cualquier caso TAD carece de los dominios BRCT 1 y 2 de TopBP1, lo que sugiere que Rad9 podría interaccionar con el complejo ATR/ATRIP a través de otras superficies. De hecho, está descrito que en ausencia del dominio putativo de unión de ATRIP a RPA, ATR no se localiza en focos de daño pero aún puede fosforilar a Chk1, argumentando que otras interacciones no detectadas entre RPA y ATRIP son suficientes para promover la actividad de ATR frente a Chk1, aun cuando no sea detectable en focos de ssDNA (Ball et al., 2005).



**Discusión Figura 2 | Modelo de actividad de ATR activado por TAD.** Proponemos un modelo en el cual sólo en las inmediaciones de la cromatina ATR podría tener acceso a sus substratos. Así, los niveles de TAD han de ser muy altos para alcanzar a esta subpoblación, siendo fútil su efecto en el resto del nucleoplasma.

De esta forma, RPA y Rad9, ambas proteínas unidas a la cromatina en presencia y ausencia de daño (aunque Rad9 no igualmente), podrían estar colaborando en el reclutamiento de ATR (Cuadrado et al., 2006; Zou, 2002); a pesar de que cada molécula de ATR pudiera ser activable por TAD, solo la fracción unida a la cromatina en ausencia de daño sería móvil y estaría en

posición de poder fosforilar a sus substratos. Ya que ésta fracción es considerablemente menor en ausencia de daño (Cuadrado et al., 2006), ésta podría ser otra razón por la cual la activación por TAD sólo es eficiente a niveles excepcionalmente altos de expresión. En base a esta hipótesis estamos tratando de desarrollar versiones más eficientes de la quimera, fusionando dominios adicionales que favorezcan su localización en la cromatina. Este proyecto es esencial para el funcionamiento del sistema en un modelo de ratón, y se presenta brevemente en el apartado 6.

### 3. ATR estimulada por TAD es capaz de activar los checkpoints en G1 y G2

Hemos demostrado que la eficiente activación de ATR por TAD puede provocar el arresto celular a través de los checkpoints establecidos en las fronteras G1/S y G2/M. Como quinasa de respuesta al daño está ampliamente establecido el papel de ATR en el control del checkpoint en G2 a través de Chk1 (Liu et al., 2000). En nuestro sistema distintas evidencias demuestran que, en ausencia de daño, ATR es capaz de desencadenar un checkpoint G2/M dependiente de Chk1. En primer lugar la robusta fosforilación observada (figura 19) en las serinas 317 y 345 tras la adición de 4OHT sugiere que Chk1 es rápidamente activado por ATR. Estas fosforilaciones son eventos esenciales en respuesta a estrés genotóxico y son necesarias para la correcta actividad de la quinasa tanto *in vivo* como *in vitro* (Liu et al., 2000; Niida et al., 2007; Zhao and Piwnica-Worms, 2001). En segundo lugar, la fuerte activación del checkpoint en G2 tras la adición de 4OHT es completamente impedida con el uso de UCN-01, un inhibidor específico de Chk1 (Busby et al., 2000). Finalmente, la reducción de los niveles de Chk1 por siRNA correlaciona con la menor eficiencia de la parada en G2 en respuesta a 4OHT.

Mientras que la actividad de ATM es esencial para el checkpoint G2/M temprano en respuesta a IR (Xu et al., 2002), ATR y Chk1 son necesarios también para el tardío (Brown and Baltimore, 2003; Liu et al., 2000; Tomimatsu et al., 2009). Estas observaciones reproducen la dependencia de ATM para el rápido procesamiento de las rupturas, necesario para un reclutamiento y activación eficientes de ATR (Adams et al., 2006; Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006). En base a esta estricta jerarquía y a la ausencia total tanto de actividad ATM como de ssDNA por adición de 4OHT (figura 16 a, fosforilación de chk2; figura 9), podemos deducir que el checkpoint activado por la adición de 4OHT es directamente inducido por ATR-Chk1. Esta afirmación es casi trivial a la luz de todas nuestras evidencias, pero no por ello irrelevante. Supone que la activación artificial de TAD resulta suficiente no sólo para fosforilar Chk1 sino también para inducir su actividad, y que además no requiere la intrincada secuencia de procesos necesarios para activar el checkpoint en G2 en respuesta a daño. Aparte, aunque no fue comprobado explícitamente, la “demostración del posible” o “*proof of principle*” implica que eventos como la difusión de Chk1 de la cromatina, necesaria mecanísticamente para desencadenar una respuesta nuclear global, estaría teniendo lugar por la actividad de ATR en ausencia de daño (Smits et al., 2006). La evidencia de que la fosforilación en la serina 317 es estrictamente necesaria para este fenómeno concuerda con nuestras observaciones (Wilsker et al., 2008).

Hemos observado que en respuesta a TAD la eficacia del checkpoint es muy sensible a la actividad de Chk1, como demuestra el hecho de que con 4 horas de tratamiento con UCN01 prácticamente todo el arresto establecido se revierte. Esta evidencia encaja con la visión de que la actividad inducida artificialmente de Chk1 sea la única fuerza motriz par desactivar al complejo CDK1/ciclinaB. En respuesta a IR el efecto de UCN-01 fue menor, probablemente porque a altas dosis de irradiación (10Gy) la señal generada es tan alta que el inhibidor no es capaz de inhabilitar tan eficazmente la respuesta. Por otro lado, UCN-01 es especialmente eficaz en inhibir la parada en G2 en células deficientes en p53 (Busby et al., 2000; Wang et al., 1996), lo que podría indicar que la robusta inducción de p53 en respuesta a IR (ATM y ATR) estaría restando la capacidad de inhibición del checkpoint por UCN-01. Siguiendo este razonamiento, se podría especular que la activación de ATR por TAD es capaz de establecer un checkpoint temprano esencialmente dependiente de Chk1 con una efectividad semejante a 10Gy de IR.

Mientras que la rápida inducción del checkpoint G2/M por Chk1 (primeras 8 horas) correlaciona con la cinética de fosforilación tras la exposición a 4OHT, su práctica desaparición tras 24 horas de señalización persistente implica que otra vía es responsable del mantenimiento del checkpoint a 24 y 48 horas. Existen evidencias de que la parada en G2 en respuesta a daño es mantenida por efectores transcripcionales de p53 como p21 (Bunz et al., 1998). En respuesta a TAD p21 se empieza a expresar a las pocas horas y alcanza su máximo a las 24, por lo que podría ser el responsable de relevar a la actividad quinasa de Chk1 en la inhibición de CDK1. Ya que la expresión de p21 refleja la capacidad de transactivación de p53 en respuesta a la señal de ATR, otras dianas conocidas con capacidad de regular la parada en G2, como 14-3-3 y Gadd45, podrían estar también implicadas en el mantenimiento del checkpoint inducido por ATR. La nula disminución en la proliferación de los MEF p53 -/- por acción de TAD (figura 12) confirma genéticamente la implicación de p53 en la parada en G2 (sí observada en los MEF silvestres senescentes).

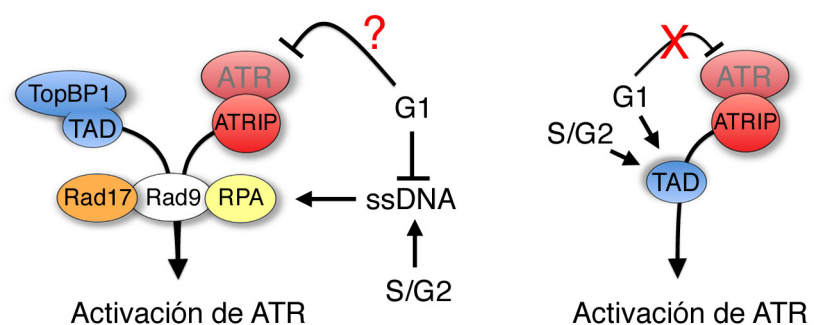


## 4. ATR es activada por TAD en G1, complementando la ausencia de ATM

Las evidencias que reflejan la capacidad de ATR de establecer el checkpoint en G2 en ausencia de daño no hacen más que confirmar lo que ya se sabe sobre el control de esta transición del ciclo celular. Sin embargo, la activación del checkpoint independiente de ATM en la frontera G1/S cuestiona el modelo establecido, por el cual es ATM (y en su ausencia DNA-PKcs) la quinasa que controla la entrada en fase S en respuesta a daño en el ADN, y diferentes modos de control evitan que la vía de ATR pueda activarse en G1. Diferentes estudios llevados a cabo en levaduras han demostrado que la resección de los DSB sólo ocurre en S y G2, lo que fue corroborado por la ausencia de actividad ATR en G1 en células de mamífero (Cuadrado et al., 2006; Ira et al., 2004; Jazayeri et al., 2006). Por otro lado, aunque Chk1 pudiera llegar a expresarse al final de G1, su activación por ATR esta restringida igualmente a S y G2 paralelamente a la expresión de Claspin sólo en esas fases del ciclo (Mailand et al., 2006a).

Hemos visto que una clara actividad de ATR en células en G1 (figura 20) es probablemente la fuente de señalización que provoca la inhibición de la actividad CDK y la parada en el checkpoint. Como comenzaba a argumentar en la sección de resultados, la independencia del sistema TAD<sup>ER</sup> de los mecanismos endógenos de regulación es la razón más probable de su capacidad de activar ATR en G1. La inhibición de los mecanismos de resección que generen ssDNA en G1 podría verse como la garantía de la célula para prevenir que el mecanismo de activación de ATR se dispare. No obstante, la principal función de la resección es procesar un DSB para que sea reparado por HR (Yata and Esashi, 2009). Es esencial generar la longitud necesaria de ssDNA que

permita invadir la cromátida hermana y establecer suficiente homología. En G1 la recombinación homóloga es inservible y podría ser fuente de translocaciones si, al generarse ssDNA, se produjeran invasiones erróneas en zonas de pseudo-homología de otros cromosomas. Por lo



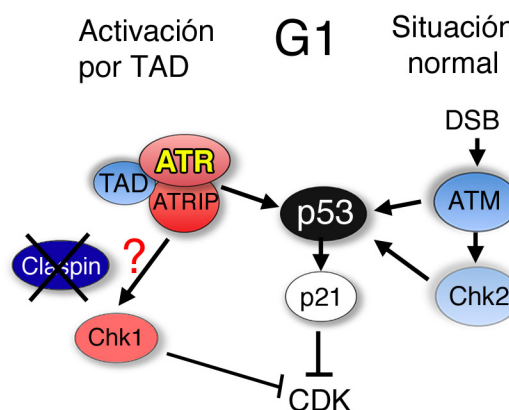
**Discusión Figura 3 | Actividad de ATR en G1** El modelo representa cómo en situaciones normales la ausencia de resección en G1 imposibilita el reclutamiento de factores necesario para activar ATR. Con TAD esa limitación se supera, demostrando que la interacción con TopBP1 es el paso limitante y no otros mecanismos inhibidores en G1.



tanto la no activación de ATR en G1 puede entenderse no como un fin sino como una consecuencia de la supresión de la HR, ya que ambas rutas son promovidas por la misma estructura. Es lógico pensar que la fidelidad reparadora de la HR haya sido una prioridad evolutiva, de forma que se ha seleccionado el desarrollo de mecanismos para reconocer y señalar con la mayor eficiencia tanto los DSB reseccionados como los no reseccionados. En definitiva, mientras que la condición indispensable para la célula es reprimir la HR/resección en G1, la no activación de ATR puede ser una consecuencia secundaria. Así ATR estaría siempre ‘dispuesta’ a ser activada en el momento que sus reclutadores la pongan en funcionamiento, lo que ocurre únicamente en S y G2 (Huertas and Jackson, 2009) (Discusión, figura 3). De los principales mediadores y adaptadores del complejo ATR/ATRIP únicamente Claspin tiene una estricta regulación dependiente de ciclo, por lo que al menos otros substratos diferentes a Chk1 pueden ser potencialmente fosforilados por ATR en G1 si se promueve su interacción con TopBP1: generando ssDNA o expresando TAD libre.

Por lo tanto una ATR activa en G1 podría fosforilar de forma estocástica efectores de la parada del ciclo, sobre la base de que otros substratos (H2AX, Smc1, Rad17, Chk1) también son alcanzados en ausencia de las estructuras activadoras generadas por la presencia de ssDNA (Discusión, figura 4). En este caso la implicación de p53 es directa, como demuestra la ausencia de checkpoint en los MEF p53 <sup>-/-</sup> por adición de 4OHT (figura 11). Como se ha probado para ATM en ausencia de Chk2 (Takai et al., 2002), y para DNA-PKcs en células ATM <sup>-/-</sup> (Callen et al., 2009a), las

PIKKs pueden directamente inducir la estabilización de p53, por lo que ATR activada ectópicamente en G1 estaría también potencialmente capacitada para inducir la parada proliferativa dependiente de p53 (Tibbetts et al., 1999). Además, de acuerdo con el modelo aleatorio de activación, la capacidad catalítica de ATR en G1 es similar a otras fases del ciclo cuando es estimulada por TAD, reafirmando su potencial de inducir eficientemente la parada del ciclo en las transiciones G2/M y G1/S.



**Discusión Figura 4 | Checkpoint G1/S mediado por ATR** En situaciones normales el checkpoint en G1 es estrictamente controlado por ATM. En nuestro sistema la parada del ciclo en G1 inducida por TAD es dependiente de p53, y debido a la ausencia de Claspin en G1, podría ser mediada por ATR directamente. No obstante Chk1 podría activarse en G1 si Claspin actuara sólo como adaptador (innecesario en el caso de TAD).

Dadas las evidencias del comportamiento estocástico de TAD y de la estricta dependencia de Chk1 del checkpoint en G2, no descartamos la posibilidad de que en estas circunstancias Chk1 pudiera ser activado por ATR en G1. Se ha publicado que existe una pequeña ventana en G1 (previsiblemente después de la fosforilación de Rb) en la que Chk1, a pesar de expresarse, no es activable en respuesta a daño por la ausencia de Claspin (Jazayeri et al., 2006; Liu et al., 2006a). Como se comentaba en el apartado anterior, no se ha descartado formalmente si Claspin es únicamente un adaptador que localice transitoriamente a Chk1 para ser fosforilado por ATR. De esta forma, podría especularse que con el sistema TAD ATR activa pudiera físicamente alcanzar a Chk1 y fosforilarlo en esa ventana de G1, participando así en el checkpoint. Sin embargo, no pudimos llegar a un resultado concluyente a pesar de haber utilizado diferentes estrategias. Mediante siRNA no pudimos detectar un efecto significativo en la inhibición del checkpoint en G1, y el inhibidor UCN-01 no es aplicable a este ensayo ya que por sí solo induce una parada en G1 (al menos en nuestras células, (Syljuasen et al., 2005)). Intentamos detectar de forma análoga a H2AX (figura 21) la fosforilación de Chk1 en G1, pero nuestros anticuerpos contra la formas fosforiladas no funcionaron.

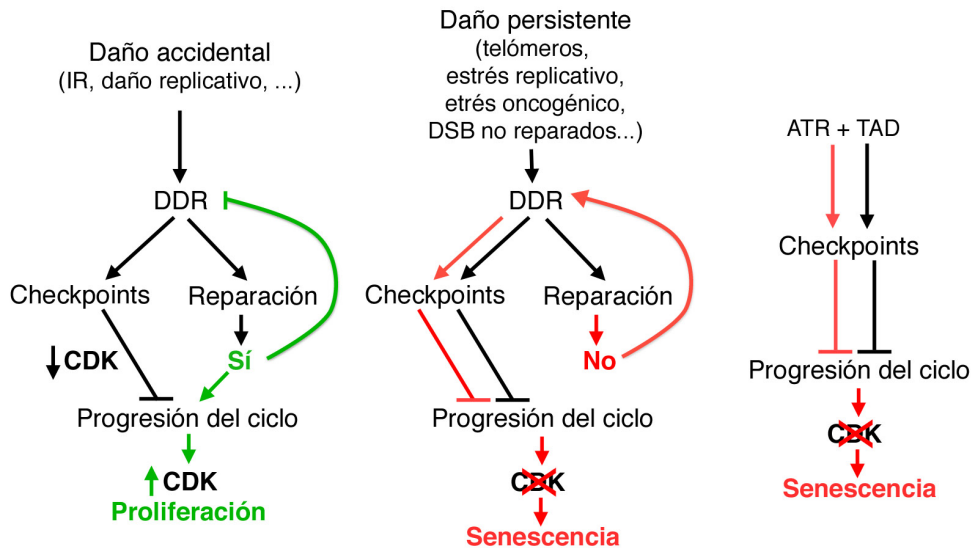
Una hipotética fosforilación de Chk1 en G1 sugeriría que el papel de Claspin en este fenómeno es el de un mero adaptador. De forma paralela al funcionamiento de ATR, Claspin sólo sería necesaria para que Chk1 fuera eficientemente atraído a las zonas de ssDNA y permitir su fosforilación. Esta posibilidad queda por ser evaluada.

Como se adelantaba en la sección de resultados, las implicaciones de que ATR pueda complementar la función de ATM en el checkpoint G1/S apuntan directamente a la enfermedad Ataxia-Telangiectasia. Las células de los pacientes A-T exhiben una clara deficiencia en la señalización en todos los checkpoints, pero es la exclusividad en el control de la transición en G1 lo que provoca que estas células dependan especialmente de los mecanismos funcionales en las fases S y G2 para mantener la integridad de su genoma. Sin embargo nuestros resultados sugieren que esas células contienen otra quinasa con capacidades catalíticas homólogas que podría suplir a ATM, al menos, en el eficiente control de los checkpoints. Es difícil imaginar una aplicación terapéutica que pudiera derivarse de esta evidencia, ya que A-T es el resultado de una degeneración crónica y un posible tratamiento debería ser administrado de forma constante. La simple activación de ATR emulando a TAD no tendría ningún tipo de especificidad y la activación persistente de ATR tendría efectos adversos al menos en tejidos proliferativos. Idealmente podría llegarse a diseñar una droga que incrementara las posibilidades de que ATR pudiera ser activada directamente en respuesta a DSB. A pesar de ser una mera especulación, inhibir la protección de los DSB ante la resección o directamente estimularla podría activar ATR de forma endógena en G1. Por supuesto no se

pueden predecir cuáles serían las consecuencias de incrementar la resección sobre la recombinación homóloga con una estrategia de este tipo, pero quizás podría acabar teniendo efectos beneficiosos en células deficientes en ATM.

## **5. La señalización persistente de ATR inducida por TAD puede desencadenar senescencia en células en cultivo**

Hemos mostrado cómo la activación persistente de ATR puede llevar a células tanto primarias como inmortales a senescencia. Entendida como una respuesta irreversible a una amenaza severa para la integridad del ADN de la célula, la entrada en senescencia se ha considerado un proceso dirigido esencialmente por la DDR. En el caso de senescencia replicativa se han encontrado evidencias de que los telómeros acortados son reconocidos como DSB y tienen una DDR activa (D'adda Di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; Martens et al., 2000; Takai et al., 2003). Debido al estrés oxidativo al que las células están expuestas en los cultivos tradicionales, la senescencia tal como Hayflick la observó esta acompañada de acumulación de daño persistente en el ADN (Di Micco et al., 2008; Parrinello et al., 2003). La exposición continuada a agentes genotóxicos puede reproducir este daño persistente y provocar la entrada en senescencia (Di Leonardo et al., 1994; Te Poele et al., 2002). En este escenario nuestros resultados se suman por tanto a un importante número de evidencias que vinculan la senescencia con la presencia constante de daño en el ADN. En nuestro caso, sin embargo, es necesario de nuevo remarcar que la activación de la señal, sin necesidad de generar el daño físicamente, es suficiente para desencadenar los mecanismos necesarios para la senescencia (Discusión, figura 5). Mientras que se puede afirmar que la parada transitoria del ciclo es un proceso bioquímicamente dependiente de la DDR, no se puede asegurar que en circunstancias de daño crónico en el ADN otras rutas estén siendo activadas por anomalías asociadas al estrés. Dicho de otro modo, el conjunto de fenómenos y desequilibrios que tienen lugar de forma persistente tanto en una célula con telómeros demasiado cortos, como en presencia de altos niveles de ROS o de altas concentraciones de agentes genotóxicos, puede provocar la activación de otras rutas de señalización que contribuyan a que la consecuencia final sea la parada permanente del ciclo. En nuestro caso hemos observado que un evento singular y preciso como la activación catalítica de ATR, en ausencia de daño, es suficiente para recapitular un fenómeno biológico normalmente asociado a situaciones crónicas de estrés.



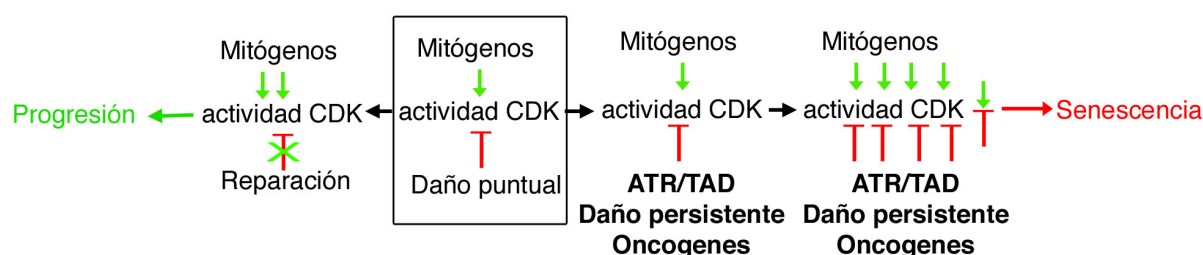
**Discusión Figura 5 | Modelo de actuación de la DDR en respuesta a daño accidental o persistente.** Un daño accidental dispara transitoriamente la DDR hasta que es reparado. Una vez la actividad CDK se recupera, las células vuelven a proliferar. En una situación de daño persistente, la activación constante de la DDR llevaría a la total desactivación de las CDKs, provocando la parada permanente del ciclo y la iniciación del programa de senescencia. Este proceso, aún en ausencia de daño, es reproducido por la señal persistente de ATR.

Por lo tanto, la cascada de fosforilaciones generada por la DDR es capaz de reproducir por sí sola un estado de parada permanente que desemboca en senescencia. La activación de los checkpoints por TAD se puede explicar simplemente por su capacidad de generar una señal por encima del umbral necesario para inactivar las CDKs. Desde este punto de vista, sin embargo, resulta llamativo que el bloqueo persistente de la progresión en el ciclo induzca los fenómenos que acompañan a la entrada en senescencia, y que provocan un cambio drástico tanto en el metabolismo como en la estructura celular. Por otro lado, se podría especular que la parada canónica del ciclo a través de los checkpoints siempre precede al posterior programa senescente. Así, la duración de esa parada podría estar sirviendo a la célula de indicador de la gravedad de la amenaza a la que se enfrenta. De esta forma, si pasado un determinado tiempo el daño o el estrés que provocaron la parada no se han eliminado, se dispararía automáticamente la senescencia. Si la activación constante de ATR se traduce en una parada del ciclo continuada, esta única señal podría entonces ser capaz de reproducir el *a priori* complejo programa necesario para desencadenar la senescencia celular (Discusión figura 6).

En este sentido hemos recabado evidencias de que la actividad CDK puede ser eficientemente inhibida por la señal persistente inducida por TAD, y que precisamente la capacidad de reducir la actividad CDK por debajo de un umbral (en función de la intensidad de la señal generada por los niveles de expresión de TAD) puede ser el factor determinante para desencadenar una parada permanente. En cualquier caso, nuestros resultados ponen en

evidencia que, además de los niveles (difíciles de referirse a una cantidad de daño equivalente, al tratarse un sistema artificial), la persistencia de la señalización del daño es una característica fundamental para poder inducir senescencia. Sólo la presencia de un estímulo que amenace la integridad del ADN de forma constante sería capaz de generar una respuesta senescente a través de la DDR.

Visto así, y suponiendo que la senescencia es una respuesta irreversible, sigue siendo una incógnita qué ocurre para que una célula sufra una transición entre una parada transitoria constante (entendida como mantenida por la DDR constantemente) y una parada permanente del ciclo. De igual forma es difícil de precisar cuánto tiempo es necesario para cruzar esa barrera o, en otras palabras, si existe un mínimo indispensable. En cualquier caso, se podría especular que durante ese tiempo la célula estaría percibiendo una situación conflictiva entre señales mitogénicas y antiproliferativas (señalización de ATR e inhibidores de CDK) que, sentida de forma crónica, desencadenaría la salida del ciclo permanentemente como medida preventiva.



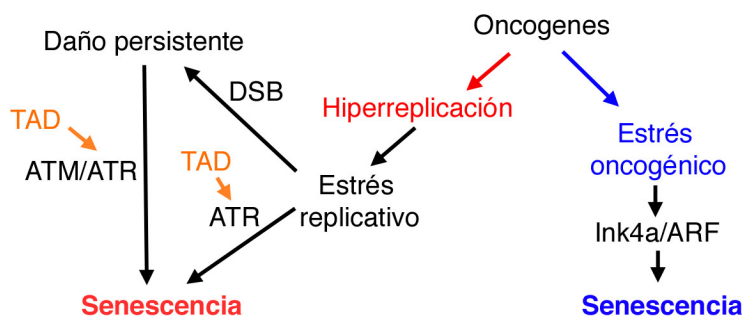
**Discusión Figura 6 | Mecanismo disparador común de la senescencia.** En base a nuestros resultados proponemos que la constante inhibición de las CDKs en presencia de mitógenos puede ser el desencadenante común de la senescencia por daño persistente.

La senescencia podría entenderse entonces como un ‘punto de restricción’ como el existente en G1 pero a la inversa (Planas-Silva and Weinberg, 1997). Al igual que se atribuye a Rb la función de ‘reloj’ que mide el tiempo para que se atravesase el punto de restricción de entrada en fase S (en base a su nivel de fosforilación, progresivamente elevado por las CDKs), podría existir otro que memorizara el tiempo en que la presencia de daño persiste, hasta desencadenar cambios irreversibles que eviten que la célula vuelva a ciclar. De esta forma, al igual que una célula proliferando no necesita estímulos mitogénicos más allá del punto de restricción en G1 para progresar hacia S, una célula senescente ya no dependería de la señalización persistente para mantener estático el ciclo.

Como se presentaba en los resultados, la irreversibilidad de la senescencia es una cuestión que no ha sido formalmente demostrada. En este punto no podemos concluir tampoco que la

senescencia inducida por una DDR persistente sea irreversible. No obstante, la ausencia de daño real en nuestro sistema coloca a las células llevadas a senescencia en una situación particular. Una vez la señalización de ATR se ha apagado y las fosforilaciones han revertido, nada las debería diferenciar desde el punto de vista genómico de células en proliferación. Por lo tanto, en el caso hipotético de que la senescencia fuera reversible, uno podría esperar que todas las células volvieran a proliferar sincrónica o asincrónicamente (como ocurre en tiempos cortos de inducción, figura 37). Sin embargo, la única observación clara que hemos podido confirmar es exactamente la contraria en células llevadas a senescencia por una DDR persistente. Este hecho sugiere que una proporción del total de células alcanza un estado metabólicamente activo, a través de la parada persistente del ciclo, del cual ya no puede escapar para volver a proliferar independientemente de que su ADN no esté dañado. Este estado representaría una barrera más allá de la cual la célula es formalmente senescente.

La naturaleza de la señal que provoca la entrada en senescencia en respuesta a oncogenes (OIS), conocida como estrés oncogénico, ha sido siempre fuente de un intenso debate. P53, efector fundamental de la senescencia junto a p16, es inducido exclusivamente por ARF en respuesta a oncogenes como Ras (Palmero et al., 1998; Serrano et al., 1997), lo que ha dejado a la DDR en un segundo plano como supresor tumoral ya que ARF se induce por vías independientes (Christophorou et al., 2006; Kamijo et al., 1997). Sin embargo tanto p53 como



**Discusión Figura 7 | La senescencia inducida por TAD es independiente de Ink4/ARF** Nuestros resultados apoyan el modelo según el cual los oncogenes pueden provocar senescencia tanto generando hiperreplicación como otras señales, que serían sentidas por el locus Ink4a/ARF.

p16 se han encontrado inducidos en senescencia asociada a DDR (Beauséjour et al., 2003; Jacobs and de Lange, 2004; Stein et al., 1999), sugiriendo que o bien existen diferentes tipos de estrés que acaban siendo procesados por la célula por la misma vía, o que

tanto la senescencia replicativa/oxidativa como la inducida por oncogenes esta provocada por alteraciones metabólicas semejantes. Nuestros resultados (figura 15) reafirman esta dualidad, pero al mismo tiempo la complementan, aportando la evidencia de que, en ausencia de ARF, la activación persistente de la DDR también puede inducir senescencia en células en cultivo (discusión figura 7). La condición de la persistencia se cumple de nuevo en los trabajos que vinculan la OIS y la DDR, que muestran como el estímulo proliferativo generado por los



oncogenes se traduce en una hiper-replicación del ADN, lo que provoca una presencia constante de daño (en fase S) que acaba induciendo la entrada en senescencia (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Estos trabajos involucran incluso a Ras en la generación de daño persistente, intentando clarificar o descartar el papel de ARF como inductor de senescencia en respuesta a oncogenes. Sin embargo, es importante puntualizar que aunque la senescencia es un fenómeno observable tanto en células humanas como murinas en cultivo, existen algunas diferencias en las rutas metabólicas que la provocan en cada especie. Así, en un contexto humano ARF no es tan relevante para la senescencia, y es precisamente en células humanas donde se ha llevado a cabo casi todo el trabajo que liga OIS y DDR. Por otro lado no todos los oncogenes provocan daño en el ADN, lo que en parte resulta lógico ya que no existe un único ‘pedal’ de aceleración que dirija la hiper-proliferación celular y por lo tanto no todos han de tener la potencia señalizadora suficiente para generar específicamente daño de forma persistente. El denominador común de estos estudios no es entonces el estrés oncogénico, sino, de nuevo, si los desequilibrios asociados al mismo generan un daño constante en el ADN. De esta forma, como corrobora nuestro trabajo, la DDR representa, entre otras, una barrera principal en el camino de la transformación maligna por su papel primordial en la supresión de la hiper-proliferación celular.

Durante años se ha cuestionado si la senescencia celular era un efecto únicamente de las condiciones extremas presentes en cultivo (alta concentración de oxígeno y mitógenos) y de la sobreexpresión de oncogenes por encima de sus niveles normales en tumores (Sherr and DePinho, 2000). Sin embargo, en los años recientes han ido apareciendo evidencias de senescencia en tumores *in vivo* (Braig et al., 2005; Collado, 2005; Dankort et al., 2007). Asimismo, la DDR ha emergido como una barrera primordial en la progresión tumoral al encontrarse signos de activación exclusivamente en lesiones primarias (Bartkova, 2005; Gorgoulis, 2005; Nuciforo et al., 2007). Esta señal se desencadenaría paralelamente al primer aumento proliferativo del tejido, hasta que la presión oncogénica acabara desactivando la acción antiproliferativa de la DDR, favoreciéndose la progresión del tumor a estadios más agresivos. De nuevo, como ocurre con los trabajos realizados en cultivo, existe un esfuerzo importante para reproducir y vincular senescencia y DDR *in vivo*, aunque hasta ahora algunos modelos han colocado a la DDR precisamente en un papel secundario en la acción antitumoral mediada por p53. Estos trabajos, siguiendo las evidencias observadas *in vitro*, reafirman el papel de ARF como principal mediador de la acción antitumoral de p53, a la vez que descartan que su activación por medio de la DDR represente una barrera en la progresión cancerosa (Christophorou et al., 2006; Efeyan et al., 2006). Sin embargo, al igual que va tomando forma la visión de que no todos los oncogenes provocan una DDR suficiente para limitar la



transformación maligna, es posible que la metodología utilizada en estos modelos no active el tipo e intensidad de señal necesaria para desencadenar las capacidades antitumorales de la DDR. De hecho, en uno de ellos se descarta la relevancia de la DDR alegando que la acción temprana de p53 en respuesta a un único estímulo de IR no detiene la progresión tumoral (Christophorou et al., 2006), cuando las evidencias, incluyendo el trabajo presentado en esta tesis, apuntan a que la persistencia de la señal es clave para desencadenar los efectos antioncogénicos de la DDR. Por lo tanto, restringida por su papel protector de la integridad del genoma, la DDR tiene la capacidad de reaccionar a determinados estímulos oncogénicos desencadenando una respuesta antitumoral senescente. Complementariamente, otros estímulos oncogénicos, cuyos mecanismos moleculares de detección están todavía por dilucidar, también serían percibidos por la célula como una amenaza para la homeostasis a pesar de no implicar la generación de daño en el ADN. En cualquier caso, nuestros resultados confirman el potencial de la DDR como mecanismo antitumoral dependiente de p53, y plantean la posibilidad de utilizar la DDR como un freno proliferativo en la progresión maligna *in vivo*.

## 6. Activación e inhibición de ATR como terapia contra el cáncer

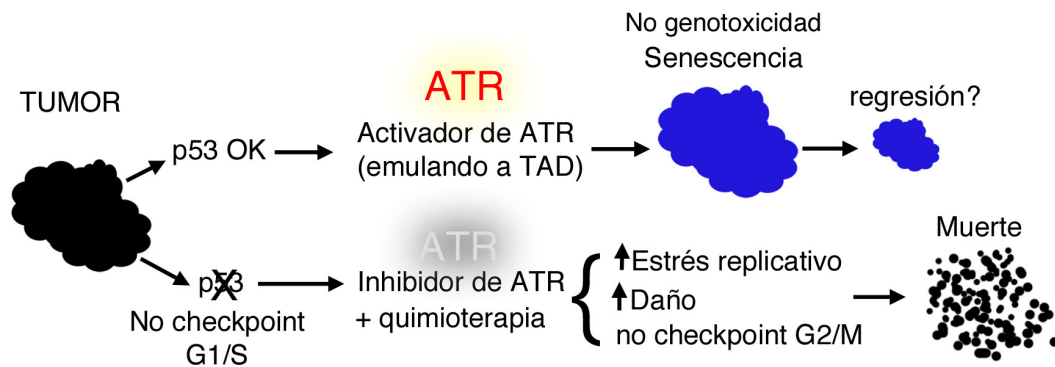
El objetivo de desarrollar modelos animales con el sistema inducible TAD era examinar las verdaderas capacidades de ATR como supresor tumoral, y es una parte esencial del proyecto iniciado con esta tesis. El entorno fisiológico de un tumor es radicalmente distinto a una placa de cultivo, por lo que sólo *in vivo* se podría analizar si la activación ectópica de ATR es capaz de detener o, en cooperación con otros mecanismos antitumorales, eliminar un tumor real. Aunque únicamente de forma especulativa, podríamos predecir que si el sistema TAD reprodujera la inducción de senescencia en tumores (o incluso apoptosis en determinados tipos celulares), tendríamos la evidencia de que la estimulación ectópica de ATR sería una potencial estrategia terapéutica contra el cáncer (Discusión, figura 8). Existen numerosos casos que demuestran que la senescencia es una respuesta antitumoral fundamental que actúa en los primeros estadios de la transformación maligna (Braig et al., 2005; Collado, 2005; Dankort et al., 2007), pero que también tiene potencial cuando p53 es reintroducido en tumores más avanzados (Martins et al., 2006; Xue et al., 2007). Dado que ATR es necesaria para la supervivencia de cualquier célula proliferante, tumoral o no tumoral, la posibilidad de sobreactivar ATR estaría siempre intacta. En cambio, dependiendo del espectro de mutaciones del tumor, es posible que algunos de sus efectores, en especial p53, no fueran funcionales,

inhabilitando así la acción antiproliferativa de ATR. Esta observación podría limitar el uso de esta posible terapia a aquellos tumores en los que p53 todavía es funcional, aunque no se puede negar que en el escenario de un tumor (y en cada tipo específico) la actividad de ATR pudiera detener la proliferación celular también en ausencia de p53. En cualquier caso, la terapia se podría ampliar también a aquellos casos en los que la presión oncogénica ha silenciado la actividad de p53 mediante la sobreexpresión de Mdm2, combinándola con inhibidores de éste (Vassilev, 2007). La observación de que existen líneas inmortales en cultivo con altas tasas de proliferación y estrés replicativo y que, aún así, tienen un p53 funcionalmente activable por la DDR, sugiere que en un tumor en que la presencia o reactivación de p53 no tuviera un efecto *per se* en la supresión tumoral, ésta se podría alcanzar mediante la sobreactivación de ATR.

El otro pilar sobre el que se sustenta la hipótesis de una terapia basada en la activación de ATR es que, a priori, sería posible reproducir la interacción física de TAD con el PRD simplemente mediante un compuesto químico. A través de síntesis dirigida, en base a la configuración electrostática de la superficie de interacción entre ambas proteínas, podría aislarse un compuesto o pequeño péptido que mimetizara el módulo activo de TAD y reprodujera el hipotético cambio conformacional que tiene lugar en ATR. Esta molécula podría administrarse como la quimioterapia convencional, con la ventaja fundamental de que sería una terapia no genotóxica. Aunque se puede especular que los efectos secundarios de activar ATR en tejidos proliferantes podrían ser homólogos a los de la quimioterapia actual, no se estaría generando daño en el ADN de las células, limitándose por tanto los efectos citotóxicos sobre otros tejidos.

Este proyecto está en desarrollo aunque todavía en sus primeros pasos tras los intentos fallidos de generar modelos animales que incorporen el sistema TAD. Como se explica y discute ampliamente en esta tesis, la limitación que supone alcanzar unos niveles mínimos de expresión de TAD ha hecho inútiles nuestros esfuerzos hasta ahora. Mientras que estas limitaciones se pueden superar en células en cultivo, pues se pueden realizar repetidos ensayos y análisis directos hasta alcanzar los niveles necesarios de expresión de TAD, no se puede aplicar el mismo principio de prueba y error en la generación de un ratón funcional. Como se adelanta en la sección de resultados, es probable que la única solución posible sea introducir modificaciones en la quimera que incrementen drásticamente la capacidad de TAD de activar ATR, para no depender de alcanzar unos niveles de expresión que, hasta ahora, ha sido, con mucho, imposible en los modelos transgénicos desarrollados. Como se discute en apartados anteriores, tenemos evidencias que sugieren que sólo la subpoblación de ATR más cercana a la cromatina es la que, activada por TAD, es capaz de fosforilar a sus substratos y desencadenar las respuestas celulares de la DDR. Ya que a priori TAD actuaría de forma aleatoria por todo el

núcleo, es posible que los altos niveles de expresión sean necesarios para alcanzar eficientemente ese porcentaje de ATR, localizado de forma activa en una zona que se puede considerar como un subcompartimento nuclear. Por lo tanto, nuestra estrategia en desarrollo se basa en localizar también activamente a TAD en las inmediaciones de la cromatina. Para ello vamos a incluir en la quimera inicial (TAD<sup>ER</sup> y TAD<sup>ER-DD</sup>) dominios de otras proteínas caracterizados por su capacidad de unirse de forma constitutiva a la cromatina. Uno de ellos es el dominio TUDOR, presente en tándem en 53BP1. Las evidencias apuntan a que este dominio es responsable de localizar la proteína en la cromatina mediante la unión a marcas epigenéticas globales como H4K20 di-metilada (Taverna et al., 2007). Examinaremos la posibilidad de fusionar también otros dominios, como los MBT, o una combinación de varios, para explorar si nuestra hipótesis es correcta.



**Discusión Figura 8 | Modelo de terapia basada en la activación o inhibición de ATR.** Si se probara la efectividad del sistema TAD in vivo, un tumor con p53 funcional podría ser tratado con un activador de ATR induciendo senescencia (terapia no genotóxica). En ausencia de p53 una terapia con inhibidores de ATR podría causar la irremediable muerte del tumor por el efecto combinado del daño genómico y ausencia de checkpoints.

La otra cara de ATR como diana terapéutica esta basada en la posibilidad de eliminar células en proliferación mediante el uso de un inhibidor, al despojarlas de las funciones esenciales de ATR en el control de la replicación y los checkpoints. El sistema de activación de ATR desarrollado en esta tesis permite identificar de forma sencilla y efectiva potenciales inhibidores de ATR. A pesar de que el proyecto está en sus primeros estadíos, hemos podido encontrar dos compuestos con una destacada capacidad de inhibir el sistema TAD<sup>ER</sup>. Es necesario en primer lugar confirmar la capacidad de estos compuestos para inhibir la actividad de ATR en respuesta a daño y estrés genotóxico. Un dato prometedor es, sin embargo, que ambos no sólo impiden la estimulación provocada por TAD, sino que son capaces incluso de reducir los niveles basales de Chk1. Este dato confirma tanto la potente actividad de estos compuestos como su especificidad por el sitio activo de ATR, ya que mientras que la estimulación por TAD podría ser inhabilitada en puntos diversos (como la interacción con el

PRD o incluso por un efecto antagonista sobre el 4OHT, esta última posibilidad descartada), la fosforilación basal de Chk1 es un proceso endógeno independiente de TAD. Estos compuestos por lo tanto podrían potencialmente inhibir de forma conjunta las actividades de ATR y Chk1, lo que sería letal para las células cancerosas. En este sentido se puede especular que estos inhibidores ciertamente aunarían los efectos de generar estrés replicativo y inhabilitar los checkpoints. Mientras que los inhibidores de Chk1 como UCN01 son especialmente eficaces en células p53 -/- únicamente por anular el checkpoint en G2, y siempre combinados con otros agentes genotóxicos, los inhibidores de ATR podrían ser mucho más letales, incluso utilizados individualmente. Para comprobar los efectos sobre la viabilidad celular en cultivo, ensayos a diferentes concentraciones nos permitirán definir el mínimo nivel de inhibición de ATR que resulte letal para diferentes líneas, así como aquel que sea selectivamente nocivo únicamente en células deficientes en p53 u otros supresores tumorales, reproduciendo el efecto sinérgico observado en células de Seckel (Murga et al, 2009).



**CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

1. La expresión del dominio de activación de TopBP1 humano (TAD), comprendido entre los aminoácidos 978 y 1286, provoca la fosforilación específica de sustratos de ATR en células tanto humanas como murinas.
2. La activación de ATR por TAD no genera rupturas en el ADN, por lo que representa un método para inducir la DDR en ausencia de daño.
3. ATR es estimulada por TAD en todas las fases del ciclo celular incluyendo G1, lo que demuestra que el único requisito para activar ATR es promover su interacción con TopBP1.
4. La activación de ATR por TAD es suficiente para desencadenar los checkpoints de daño en G1 y en G2.
5. La parada del ciclo en G1 inducida por TAD es dependiente de p53 pero independiente de ATM.
6. La activación persistente de ATR por TAD detiene la proliferación celular e induce senescencia a través de p53 e independientemente de los productos del locus Ink4a/ARF.
7. La activación de ATR por TAD aumenta la eficiencia de reparación de DSB.
8. La capacidad del TAD de activar el checkpoint G1 y de estimular la reparación independientemente de ATM sugiere que la activación de ATR podría complementar los defectos celulares observados en pacientes de Ataxia Telangiectasia (carentes de ATM).
9. Los experimentos realizados hasta ahora sugieren que la senescencia inducida por la activación persistente de ATR no es un fenómeno reversible.
10. El sistema TADER es una potente herramienta para realizar *screenings* de compuestos con el propósito de identificar inhibidores de ATR.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*. 15:2177-96.
- Adams, K.E., A.L. Medhurst, D.A. Dart, and N.D. Lakin. 2006. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *In Oncogene*. Vol. 25. 3894-904.
- Andreassen, P.R., A.D. D'Andrea, and T. Taniguchi. 2004a. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development*. 18:1958-63.
- Andreassen, P.R., A.D. D'Andrea, and T. Taniguchi. 2004b. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *In Genes & Development*. Vol. 18. 1958-63.
- Appella, E., and C.W. Anderson. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *In Eur J Biochem*. Vol. 268. 2764-72.
- Arata, Y., M. Fujita, K. Ohtani, S. Kijima, and J.Y. Kato. 2000. Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *In J Biol Chem*. Vol. 275. 6337-45.
- Ashcroft, M., M.H. Kubbutat, and K.H. Vousden. 1999. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *In Molecular and Cellular Biology*. Vol. 19. 1751-8.
- Bakkenist, C.J., and M.B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421:499-506.
- Ball, H.L., J.S. Myers, and D. Cortez. 2005. ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 16:2372-81.
- Banaszynski, L.A., L.C. Chen, L.A. Maynard-Smith, A.G. Ooi, and T.J. Wandless. 2006. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *In Cell*. Vol. 126. 995-1004.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *In FEBS Lett*. Vol. 490. 117-22.
- Bartkova, J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 434:864-870.
- Bartkova, J., Z. Hojatkou, K. Koed, A. Kræmer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J. Nesland, C. Lukas, T. Årntoft, J. Lukas, and J. Bartek. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *In Nature*. Vol. 434. 864-870.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V.C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C.L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T.D. Halazonetis, J. Bartek, and V.G. Gorgoulis. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 444:633-7.
- Batista, L.F., B. Kaina, R. Meneghini, and C.F. Menck. 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*. 681:197-208.
- Beard, C., K. Hochedlinger, K. Plath, A. Wutz, and R. Jaenisch. 2006. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis*. 44:23-8.
- Beausejour, C.M. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 22:4212-4222.
- Beausejour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *In The EMBO Journal*. Vol. 22. 4212-22.
- Becker-Catania, S.G., and R.A. Gatti. 2001. Ataxia-telangiectasia. *Adv Exp Med Biol*. 495:191-8.
- Benson, F.E., A. Stasiak, and S.C. West. 1994. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J*. 13:5764-71.
- Bermudez, V.P., L.A. Lindsey-Boltz, A.J. Cesare, Y. Maniwa, J.D. Griffith, J. Hurwitz, and A. Sancar. 2003. Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:1633-8.
- Biedermann, K.A., J.R. Sun, A.J. Giaccia, L.M. Tosto, and J.M. Brown. 1991. scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:1394-7.
- Bonilla, C., J. Melo, and D. Toczyski. 2008. Colocalization of Sensors Is Sufficient to Activate the DNA Damage Checkpoint in the Absence of Damage. *Molecular Cell*. 30:267-276.
- Booher, R.N., P.S. Holman, and A. Fattaey. 1997. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *In J Biol Chem*. Vol. 272. 22300-6.
- Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun. 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *In Curr Opin Cell Biol*. Vol. 18. 185-91.
- Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A.H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein, and C.A. Schmitt. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 436:660-5.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:297-308.
- Brown, E.J., and D. Baltimore. 2000. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*. 14:397-402.
- Brown, E.J., and D. Baltimore. 2003. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes & Development*. 17:615-28.

- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, J.I. Gordon, D. Beach, T. Jacks, and G.J. Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *In Nature*. Vol. 377. 552-7.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, J.M. Sedivy, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *In Science*. Vol. 282. 1497-501.
- Busby, E.C., D.F. Leistriz, R.T. Abraham, L.M. Karnitz, and J.N. Sarkaria. 2000. The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *In Cancer Research*. Vol. 60. 2108-12.
- Busino, L., M. Donzelli, M. Chiesa, D. Guardavaccaro, D. Ganoth, N.V. Dorrello, A. Herskho, M. Pagano, and G.F. Draetta. 2003. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *In Nature*. Vol. 426. 87-91.
- Callen, E., M. Jankovic, N. Wong, S. Zha, H.T. Chen, S. Difilippantonio, M. Di Virgilio, G. Heidkamp, F.W. Alt, A. Nussenzweig, and M. Nussenzweig. 2009a. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *In Mol Cell*. Vol. 34. 285-97.
- Callen, E., M. Jankovic, N. Wong, S. Zha, H.T. Chen, S. Difilippantonio, M. Di Virgilio, G. Heidkamp, F.W. Alt, A. Nussenzweig, and M. Nussenzweig. 2009b. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell*. 34:285-97.
- Canman, C.E., D. Lim, K.A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M.B. Kastan, and J.D. Siliciano. 1998. Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. *In Science*. Vol. 281. 1677.
- Carrano, A.C., E. Eytan, A. Herskho, and M. Pagano. 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *In Nature Cell Biology*. Vol. 1. 193-9.
- Carrassa, L., M. Broggin, F. Vikhanskaya, and G. Damia. 2003. Characterization of the 5'flanking region of the human Chk1 gene: identification of E2F1 functional sites. *In Cell Cycle*. Vol. 2. 604-9.
- Carson, C.T., R.A. Schwartz, T.H. Stracker, C.E. Lilley, D.V. Lee, and M.D. Weitzman. 2003. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J*. 22:6610-20.
- Casellas, R., A. Nussenzweig, R. Wuerffel, R. Pelanda, A. Reichlin, H. Suh, X.F. Qin, E. Besmer, A. Kenter, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1998. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J*. 17:2404-11.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M.J. Kruhlak, D.R. Pilch, D.W. Staudt, A. Lee, R.F. Bonner, W.M. Bonner, and A. Nussenzweig. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*. 5:675-9.
- Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, O.A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M.J. Difilippantonio, C. Redon, D.R. Pilch, A. Olaru, M. Eckhaus, R.D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W.M. Bonner, M.C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 296:922-7.
- Cenciarelli, C., D.S. Chiaur, D. Guardavaccaro, W. Parks, M. Vidal, and M. Pagano. 1999. Identification of a family of human F-box proteins. *In Curr Biol*. Vol. 9. 1177-9.
- Chan, D.W., B.P. Chen, S. Prithivirajasingh, A. Kurimasa, M.D. Story, J. Qin, and D.J. Chen. 2002. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*. 16:2333-8.
- Chapman, J.R., and S.P. Jackson. 2008. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *In EMBO Rep*. Vol. 9. 795-801.
- Choi, J.H., L. Lindsey-Boltz, and A. Sancar. 2007. Reconstitution of a human ATR-mediated checkpoint response to damaged DNA. *In Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 104. 13301-6.
- Christophorou, M.A., D. Martin-Zanca, L. Soucek, E.R. Lawlor, L. Brown-Swigart, E.W. Verschuren, and G.I. Evan. 2005. Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nat Genet*. 37:718-26.
- Christophorou, M.A., I. Ringshausen, A.J. Finch, L.B. Swigart, and G.I. Evan. 2006. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature*. 443:214-7.
- Collado, M. 2005. Identification of senescent cells in premalignant tumours. *Nature*. 436:642.
- Collado, M., M. Collado, J. Gil, J. Gil, A. Efeyan, A. Efeyan, C. Guerra, C. Guerra, A. Schuhmacher, A. Schuhmacher, M. Barradas, M. Barradas, A. Bengur[[acute]]A, A. Bengur[[acute]]A, A. Zaballos, A. Zaballos, J. Flores, J. Flores, M. Barbacid, M. Barbacid, D. Beach, D. Beach, M. Serrano, and M. Serrano. 2005. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *In Nature*. Vol. 436. 642.
- Collis, S.J., T.L. DeWeese, P.A. Jeggo, and A.R. Parker. 2005. The life and death of DNA-PK. *Oncogene*. 24:949-61.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin, and S.J. Elledge. 2001. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 294:1713-6.
- Cuadrado, M., B. Martinez-Pastor, M. Murga, L.I. Toledo, P. Gutierrez-Martinez, E. Lopez, and O. Fernandez-Capetillo. 2006. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *In J Exp Med*. Vol. 203. 297-303.
- Cui, X., Y. Yu, S. Gupta, Y.M. Cho, S.P. Lees-Miller, and K. Meek. 2005. Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol*. 25:10842-52.
- D'adda Di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *In Nature*. Vol. 426. 194-8.
- D'Arpa, P., C. Beardmore, and L.F. Liu. 1990. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res*. 50:6919-24.
- Daniel, J.A., M. Pellegrini, J.H. Lee, T.T. Paull, L. Feigenbaum, and A. Nussenzweig. 2008. Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo. *J Cell Biol*. 183:777-83.

- Dankort, D., E. Filenova, M. Collado, M. Serrano, K. Jones, and M. McMahon. 2007. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* 21:379-84.
- Delacroix, S., J.M. Wagner, M. Kobayashi, K. Yamamoto, and L.M. Karnitz. 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev.* 21:1472-7.
- Di Leonardo, A., S.P. Linke, K. Clarkin, and G.M. Wahl. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *In Genes & Development.* Vol. 8. 2540-51.
- Di Micco, R., A. Cicalese, M. Fumagalli, M. Dobrev, A. Verrecchia, P.G. Pelicci, and F. di Fagagna. 2008. DNA damage response activation in mouse embryonic fibroblasts undergoing replicative senescence and following spontaneous immortalization. *In Cell Cycle.* Vol. 7. 3601-6.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 444:638-42.
- Difilippantonio, S., A. Celeste, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, B. Reina San Martin, F. Van Laethem, Y.P. Yang, G.V. Petukhova, M. Eckhaus, L. Feigenbaum, K. Manova, M. Kruhlak, R.D. Camerini-Otero, S. Sharan, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2005. Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol.* 7:675-85.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, and G. Scott. .... 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *In Proceedings of the National Academy of Sciences.*
- Dirac, A. 2003. Reversal of Senescence in Mouse Fibroblasts through Lentiviral Suppression of p53. *In Journal of Biological Chemistry.* Vol. 278. 11731-11734.
- Doil, C., N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D.H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas, and C. Lukas. 2009. RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell.* 136:435-46.
- Dornan, D., H. Shimizu, L. Burch, A.J. Smith, and T.R. Hupp. 2003. The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *In Molecular and Cellular Biology.* Vol. 23. 8846-61.
- Downs, J.A., and S.P. Jackson. 2004. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:367-78.
- Dronkert, M.L., and R. Kanaar. 2001. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res.* 486:217-47.
- Duchaud, E., A. Ridet, D. Stoppa-Lyonnet, N. Janin, E. Moustacchi, and F. Rosselli. 1996. Deregulated apoptosis in ataxia telangiectasia: association with clinical stigmata and radiosensitivity. *Cancer Res.* 56:1400-4.
- Dumaz, N., and D.W. Meek. 1999. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *In The EMBO Journal.* Vol. 18. 7002-10.
- Dynan, W.S., and S. Yoo. 1998. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 26:1551-9.
- Efeyan, A., I. Garcia-Cao, D. Herranz, S. Velasco-Miguel, and M. Serrano. 2006. Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature.* 443:159.
- Efeyan, A., M. Murga, B. Martinez-Pastor, A. Ortega-Molina, R. Soria, M. Collado, O. Fernandez-Capetillo, and M. Serrano. 2009. Limited role of murine ATM in oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression. *PLoS one.* 4:e5475.
- el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *In Cell.* Vol. 75. 817-25.
- Elledge, S.J., J. Winston, and J.W. Harper. 1996. A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *In Trends in Cell Biology.* Vol. 6. 388-92.
- Esashi, F., N. Christ, J. Gannon, Y. Liu, T. Hunt, M. Jasin, and S.C. West. 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature.* 434:598-604.
- Falck, J., N. Mailand, R.G. Syljuåsen, J. Bartek, and J. Lukas. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *In Nature.* Vol. 410. 842-7.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, and P. Chambon. 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10887-90.
- Fekairi, S., S. Scaglione, C. Chahwan, E.R. Taylor, A. Tissier, S. Coulon, M.Q. Dong, C. Ruse, J.R. Yates, 3rd, P. Russell, R.P. Fuchs, C.H. McGowan, and P.H. Gaillard. 2009. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell.* 138:78-89.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, A.W. Lin, E. Querido, M.E. McCurrach, G.J. Hannon, and S. Lowe. 2002. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *In Molecular and Cellular Biology.* Vol. 22. 3497-508.
- Fernandez-Capetillo, O., H.T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P.J. Romanienko, J.C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R.D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P.B. Carpenter, W.M. Bonner, J. Chen, and A. Nussenzweig. 2002. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol.* 4:993-7.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *In DNA Repair.* Vol. 3. 959-67.
- Furuya, K., M. Poitelea, L. Guo, T. Caspari, and A.M. Carr. 2004. Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Genes Dev.* 18:1154-64.
- Geng, Y., E.N. Eaton, M. Picón, J.M. Roberts, A.S. Lundberg, A. Gifford, C. Sardet, and R.A. Weinberg. 1996. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *In Oncogene.* Vol. 12. 1173-80.
- Girard, P.M., E. Riballo, A.C. Begg, A. Waugh, and P. Jeggo. 2002. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *In Oncogene.* Vol. 21. 4191-9.



- Gire, V., and D. Wynford-Thomas. 1998. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *In* Molecular and Cellular Biology. Vol. 18. 1611-21.
- Goodarzi, A., A. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Löbrich, and P. Jeggo. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *In* Molecular Cell. Vol. 31. 167-77.
- Goodarzi, A., Y. Yu, E. Riballo, P. Douglas, S. Walker, R. Ye, C. Härer, C. Marchetti, N. Morrice, P.A. Jeggo, and S.P. Lees-Miller. 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *In* The EMBO Journal. Vol. 25. 3880-9.
- Gorgoulis, V., L. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R.A. DiTullio, N.G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas, and T.D. Halazonetis. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *In* Nature. Vol. 434. 907-13.
- Gorgoulis, V.G. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 434:907-913.
- Gottifredi, V., O. Karni-Schmidt, S.S. Shieh, and C. Prives. 2001. p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *In* Molecular and Cellular Biology. Vol. 21. 1066-76.
- Gottlieb, T.M., and S.P. Jackson. 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*. 72:131-42.
- Griffith, E., S. Walker, C.A. Martin, P. Vagnarelli, T. Stiff, B. Vernay, N. Al Sanna, A. Saggat, B. Hamel, W.C. Earnshaw, P.A. Jeggo, A.P. Jackson, and M. O'Driscoll. 2008. Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat Genet*. 40:232-6.
- Gurley, K.E., and C.J. Kemp. 2001. Synthetic lethality between mutation in Atm and DNA-PK(cs) during murine embryogenesis. *Curr Biol*. 11:191-4.
- Hakem, R. 2008. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J*. 27:589-605.
- Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek. 2008. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science*. 319:1352.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*. 345:458-460.
- Harper, J.W., J.L. Burton, and M.J. Solomon. 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *In* Genes & Development. Vol. 16. 2179-206.
- Harper, J.W., and S.J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*. 28:739-45.
- Harper, J.W., S.J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L.H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, and E. Swindell. 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *In* Mol Biol Cell. Vol. 6. 387-400.
- Hayflick, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 37:614-636.
- Hefferin, M.L., and A.E. Tomkinson. 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*. 4:639-48.
- Herbig, U., W.A. Jobling, B.P. Chen, D.J. Chen, and J.M. Sedivy. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *In* Molecular Cell. Vol. 14. 501-13.
- Hickson, I., Y. Zhao, C.J. Richardson, S.J. Green, N.M. Martin, A.I. Orr, P.M. Reaper, S.P. Jackson, N.J. Curtin, and G.C. Smith. 2004. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *In* Cancer Research. Vol. 64. 9152-9.
- Hiom, K. 2000. Homologous recombination. *Curr Biol*. 10:R359-61.
- Hirao, A., Y.Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S.J. Elledge, and T.W. Mak. 2000a. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *In* Science. Vol. 287. 1824-7.
- Hirao, A., Y.Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S.J. Elledge, and T.W. Mak. 2000b. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*. 287:1824-7.
- Hirose, Y., M.S. Berger, and R.O. Pieper. 2001. Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *In* Cancer Research. Vol. 61. 5843-9.
- Ho, G.P., S. Margossian, T. Taniguchi, and A.D. D'Andrea. 2006. Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Molecular and Cellular Biology*. 26:7005-15.
- Hochedlinger, K., Y. Yamada, C. Beard, and R. Jaenisch. 2005. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*. 121:465-77.
- Hoeijmakers, J.H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411:366-74.
- Horejsi, Z., J. Falck, C.J. Bakkenist, M.B. Kastan, J. Lukas, and J. Bartek. 2004. Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene*. 23:3122-7.
- Huen, M.S., R. Grant, I. Manke, K. Minn, X. Yu, M.B. Yaffe, and J. Chen. 2007. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 131:901-14.
- Huertas, P., and S.P. Jackson. 2009. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *In* J Biol Chem. Vol. 284. 9558-65.
- Hurley, P.J., D. Wilsker, and F. Bunz. 2007. Human cancer cells require ATR for cell cycle progression following exposure to ionizing radiation. *Oncogene*. 26:2535-42.
- Indra, A.K., X. Warot, J. Brocard, J.M. Bornert, J.H. Xiao, P. Chambon, and D. Metzger. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*. 27:4324-7.

- Inomata, K., T. Aoto, N.T. Binh, N. Okamoto, S. Tanimura, T. Wakayama, S. Iseki, E. Hara, T. Masunaga, H. Shimizu, and E.K. Nishimura. 2009. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell*. 137:1088-99.
- Ira, G., A. Pelliccioli, A. Balijja, X. Wang, S. Fiorani, W. Carotenuto, G. Liberi, D. Bressan, L. Wan, N.M. Hollingsworth, J.E. Haber, and M. Foiani. 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*. 431:1011-7.
- Jackson, S.P., and P.A. Jeggo. 1995. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci*. 20:412-5.
- Jacobs, J.J., and T. de Lange. 2004. Significant role for p16(INK4a) in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol*. 14:2302-2308.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G. Smith, J. Lukas, and S.P. Jackson. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *In Nat Cell Biol*. Vol. 8. 37-45.
- Jiang, Y., M. Rabbi, M. Kim, C. Ke, W. Lee, R.L. Clark, P.A. Mieczkowski, and P.E. Marszalek. 2009. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophys J*. 96:1151-8.
- Jin, J., T. Shirogane, L. Xu, G. Nalepa, J. Qin, S.J. Elledge, and J.W. Harper. 2003. SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *In Genes & Development*. Vol. 17. 3062-74.
- Kamijo, T., F. Zindy, M.F. Roussel, D.E. Quelle, J.R. Downing, R.A. Ashmun, G. Grosveld, and C.J. Sherr. 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*. 91:649-59.
- Kaneko, Y.S., N. Watanabe, H. Morisaki, H. Akita, A. Fujimoto, K. Tominaga, M. Terasawa, A. Tachibana, K. Ikeda, M. Nakanishi, and Y. Kaneko. 1999. Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *In Oncogene*. Vol. 18. 3673-81.
- Kanu, N., and A. Behrens. 2007. ATMIN defines an NBS1-independent pathway of ATM signalling. *EMBO J*. 26:2933-41.
- Kim, H., J. Chen, and X. Yu. 2007. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science*. 316:1202-5.
- Kim, S.M., A. Kumagai, J. Lee, and W.G. Dunphy. 2005. Phosphorylation of Chk1 by ATM- and Rad3-related (ATR) in *Xenopus* egg extracts requires binding of ATRIP to ATR but not the stable DNA-binding or coiled-coil domains of ATRIP. *J Biol Chem*. 280:38355-64.
- Kim, Y.C., G. Gerlitz, T. Furusawa, F. Catez, A. Nussenzweig, K.S. Oh, K.H. Kraemer, Y. Shiloh, and M. Bustin. 2009. Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat Cell Biol*. 11:92-6.
- Kobayashi, J., A. Antocchia, H. Tauchi, S. Matsuura, and K. Komatsu. 2004. NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 3:855-61.
- Kolas, N.K., J.R. Chapman, S. Nakada, J. Ylanko, R. Chahwan, F.D. Sweeney, S. Panier, M. Mendez, J. Wildenhain, T.M. Thomson, L. Pelletier, S.P. Jackson, and D. Durocher. 2007. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*. 318:1637-40.
- Kozlov, S.V., M.E. Graham, C. Peng, P. Chen, P.J. Robinson, and M.F. Lavin. 2006. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*. 25:3504-14.
- Kramer, E.R., N. Scheuringer, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and J.M. Peters. 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *In Mol Biol Cell*. Vol. 11. 1555-69.
- Kuhne, M., E. Riballo, N. Rief, K. Rothkamm, P. Jeggo, and M. Lobrich. 2004. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *In Cancer Research*. Vol. 64. 500-508.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L.C. Vredevelde, S. Douma, R. van Doorn, C.J. Desmet, L.A. Aarden, W.J. Mooi, and D.S. Peeper. 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 133:1019-31.
- Kumagai, A., J. Lee, H.Y. Yoo, and W.G. Dunphy. 2006. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*. 124:943-55.
- Lapenna, S., and A. Giordano. 2009. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *In Nature reviews Drug discovery*. Vol. 8. 547-66.
- Leahy, J.J., B.T. Golding, R.J. Griffin, I.R. Hardcastle, C. Richardson, L. Rigoreau, and G.C. Smith. 2004. Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *In Bioorg Med Chem Lett*. Vol. 14. 6083-7.
- Lee, J., A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem*. 282:28036-44.
- Lee, J.H., and T.T. Paull. 2004. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*. 304:93-6.
- Lee, J.H., and T.T. Paull. 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 308:551-4.
- Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *In Nature*. Vol. 351. 453-6.
- Limoli, C.L., and J.F. Ward. 1993. A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA. *Radiat Res*. 134:160-9.
- Lin, A.W. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*. 12:3008-3019.
- Liu, Q., S. Guntuku, X.S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, S. Carattini-Rivera, F. DeMayo, A. Bradley, L.A. Donehower, and S.J. Elledge. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*. 14:1448-59.
- Liu, S., S. Bekker-Jensen, N. Mailand, C. Lukas, J. Bartek, and J. Lukas. 2006a. Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation. *In Molecular and Cellular Biology*. Vol. 26. 6056-6064.

- Liu, S., S. Bekker-Jensen, N. Mailand, C. Lukas, J. Bartek, and J. Lukas. 2006b. Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation. *Molecular and Cellular Biology*. 26:6056-6064.
- Lopez-Girona, A., K. Tanaka, X.B. Chen, B.A. Baber, C.H. McGowan, and P. Russell. 2001. Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *In Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 98. 11289-94.
- Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, S. Franco, M. Gostissa, M.A. Rivera, A. Celeste, J.P. Manis, J. van Deursen, A. Nussenzweig, T.T. Paull, F.W. Alt, and J. Chen. 2006. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*. 21:187-200.
- Lovejoy, C.A., and D. Cortez. 2009. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair*:1-5.
- Lowe, S., and C.J. Sherr. 2003. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *In Current Opinion in Genetics & Development*. Vol. 13. 77-83.
- Lukas, C., J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek, and J. Lukas. 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol*. 5:255-60.
- Lukas, C., F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen, M. Goldberg, Y. Lerenthal, S.P. Jackson, J. Bartek, and J. Lukas. 2004a. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J*. 23:2674-83.
- Lukas, C., C.S. Sørensen, E. Kramer, E. Santoni-Rugiu, C. Lindeneg, J.M. Peters, J. Bartek, and J. Lukas. 1999. Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *In Nature*. Vol. 401. 815-8.
- Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek. 2004b. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *In DNA Repair*. Vol. 3. 997-1007.
- Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*. 417:639-50.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, J. Bartek, and J. Lukas. 2006a. Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *In Molecular Cell*. Vol. 23. 307-18.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, J. Bartek, and J. Lukas. 2006b. Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Molecular Cell*. 23:307-18.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Fastrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas, and J. Lukas. 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 131:887-900.
- Mailand, N., J. Falck, C. Lukas, R.G. Syljuåsen, M. Welcker, J. Bartek, and J. Lukas. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *In Science*. Vol. 288. 1425-9.
- Majka, J., S.K. Binz, M.S. Wold, and P.M. Burgers. 2006. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem*. 281:27855-61.
- Makiniemi, M., T. Hillukkala, J. Tuusa, K. Reini, M. Vaara, D. Huang, H. Pospiech, I. Majuri, T. Westerling, T.P. Makela, and J.E. Syvaoja. 2001. BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem*. 276:30399-406.
- Mallette, F.A., M.F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre. 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev*. 21:43-8.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *In Trends Biochem Sci*. Vol. 30. 630-41.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *In Nat Rev Cancer*. Vol. 9. 153-66.
- Manthey, K.C., S. Opiyo, J.G. Glanzer, D. Dimitrova, J. Elliott, and G.G. Oakley. 2007. NBS1 mediates ATR-dependent RPA hyperphosphorylation following replication-fork stall and collapse. *J Cell Sci*. 120:4221-9.
- Martens, U.M., E.A. Chavez, S.S. Poon, C. Schmoor, and P.M. Lansdorp. 2000. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res*. 256:291-299.
- Martins, C., L. Brown-Swigart, and G. Evan. 2006. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*. 127:1323-1334.
- Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316:1160-6.
- Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge. 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 282:1893-7.
- Medhurst, A.L., D.O. Warmerdam, I. Akerman, E.H. Verwayen, R. Kanaar, V.A. Smits, and N.D. Lakin. 2008. ATR and Rad17 collaborate in modulating Rad9 localisation at sites of DNA damage. *J Cell Sci*. 121:3933-40.
- Melander, F., S. Bekker-Jensen, J. Falck, J. Bartek, N. Mailand, and J. Lukas. 2008. Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. *In The Journal of Cell Biology*. Vol. 181. 213-26.
- Michaloglou, C., L. Vredeveld, M. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. Van Der Horst, D. Majoor, J. Shay, W. Mooi, and D. Peeper. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *In Nature*. Vol. 436. 720-724.
- Mimitou, E.P., and L.S. Symington. 2008. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *In Nature*. Vol. 455. 770-4.
- Miyashita, T., and J.C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 80:293-9.
- Mordes, D.A., and D. Cortez. 2008. Activation of ATR and related PIKKs. *Cell Cycle*. 7:2809-12.

- Mordes, D.A., G.G. Glick, R. Zhao, and D. Cortez. 2008a. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev.* 22:1478-89.
- Mordes, D.A., E.A. Nam, and D. Cortez. 2008b. Dpb11 activates the Mec1-Ddc2 complex. *In Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 105. 18730-4.
- Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *In Annu Rev Cell Dev Biol*. Vol. 13. 261-91.
- Murga, M., S. Bunting, M.F. Montaña, R. Soria, F. Mulero, M. Cañamero, Y. Lee, P.J. McKinnon, A. Nussenzweig, and O. Fernandez-Capetillo. 2009. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nature Genetics*.
- Murga, M., I. Jaco, Y. Fan, R. Soria, B. Martinez-Pastor, M. Cuadrado, S. Yang, M. Blasco, A. Skoultchi, and O. Fernandez-Capetillo. 2007. Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *The Journal of Cell Biology*. 178:1101-1108.
- Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *In Cell*. Vol. 116. 221-34.
- Myers, J.S., and D. Cortez. 2006. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *In J Biol Chem*. Vol. 281. 9346-50.
- Nakano, K., and K.H. Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 7:683-94.
- Nakayama, K.I., and K. Nakayama. 2005. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *In Semin Cell Dev Biol*. Vol. 16. 323-33.
- Namiki, Y., and L. Zou. 2006. ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:580-5.
- Narita, M. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 113:703-716.
- Narita, M., S. Nuñez, E. Heard, M. Narita, A. Lin, S. Hearn, D. Spector, G. Hannon, and S. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *In Cell*. Vol. 113. 703-716.
- Navadgi-Patil, V.M., and P.M. Burgers. 2008. Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase. *In J Biol Chem*. Vol. 283. 35853-9.
- New, J.H., T. Sugiyama, E. Zaitseva, and S.C. Kowalczykowski. 1998. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*. 391:407-10.
- Nghiem, P., P.K. Park, Y. Kim, C. Vaziri, and S.L. Schreiber. 2001. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *In Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 98. 9092-7.
- Nghiem, P., P.K. Park, Y.S. Kim, B.N. Desai, and S.L. Schreiber. 2002. ATR is not required for p53 activation but synergizes with p53 in the replication checkpoint. *In J Biol Chem*. Vol. 277. 4428-34.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *In Nat Rev Mol Cell Biol*. Vol. 2. 21-32.
- Niida, H., Y. Katsuno, B. Banerjee, M.P. Hande, and M. Nakanishi. 2007. Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Molecular and Cellular Biology*. 27:2572-81.
- Nishida, H., N. Tatewaki, Y. Nakajima, T. Magara, K.M. Ko, Y. Hamamori, and T. Konishi. 2009. Inhibition of ATR protein kinase activity by schisandrin B in DNA damage response. *In Nucleic Acids Research*. 10.1093/nar/gkp593.
- Nuciforo, P.G., C. Luise, M. Capra, G. Pelosi, and F. d'Adda di Fagnana. 2007. Complex engagement of DNA damage response pathways in human cancer and in lung tumor progression. *Carcinogenesis*. 28:2082-8.
- Nussenzweig, A., C. Chen, V. da Costa Soares, M. Sanchez, K. Sokol, M.C. Nussenzweig, and G.C. Li. 1996. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature*. 382:551-5.
- Nyholm, S., L. Thelander, and A. Graslund. 1993. Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemistry*. 32:11569-74.
- O'Connor, M.J., N.M. Martin, and G.C. Smith. 2007. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *In Oncogene*. Vol. 26. 7816-24.
- O'Driscoll, M., A.R. Gennery, J. Seidel, P. Concannon, and P.A. Jeggo. 2004. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)*. 3:1227-35.
- O'Driscoll, M., V.L. Ruiz-Perez, C.G. Woods, P.A. Jeggo, and J.A. Goodship. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet*. 33:497-501.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 288:1053-8.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, and Y. Nishimune. 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *In FEBS Lett*. Vol. 407. 313-9.
- Pagano, M., S.W. Tam, A.M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P.R. Yew, G.F. Draetta, and M. Rolfe. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *In Science*. Vol. 269. 682-5.
- Palmero, I., C. Pantoja, and M. Serrano. 1998. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*. 395:125-6.
- Pandita, T.K., H.B. Lieberman, D.S. Lim, S. Dhar, W. Zheng, Y. Taya, and M.B. Kastan. 2000. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene*. 19:1386-91.
- Pang, D., S. Yoo, W.S. Dynan, M. Jung, and A. Dritschilo. 1997. Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res*. 57:1412-5.
- Parker, L.L., and H. Piwnicka-Worms. 1992. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *In Science*. Vol. 257. 1955-7.
- Parrinello, S., E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov, and J. Campisi. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *In Nat Cell Biol*. Vol. 5. 741-7.
- Paulsen, R.D., and K. Cimprich. 2007. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair*. 6:953-66.



- Pellegrini, M., A. Celeste, S. Difilippantonio, R. Guo, W. Wang, L. Feigenbaum, and A. Nussenzweig. 2006. Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature*. 443:222-5.
- Petermann, E., and K. Caldecott. 2006. Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *In Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. Vol. 5. 2203.
- Peters, J.M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *In Molecular Cell*. Vol. 9. 931-43.
- Petrini, J.H., and T.H. Stracker. 2003. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13:458-62.
- Planas-Silva, M.D., and R.A. Weinberg. 1997. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* 9:768-72.
- Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N.J. Liégeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K.Y. Chen, I. Orlov, H.W. Lee, C. Cordon-Cardo, and R.A. DePinho. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *In Cell*. Vol. 92. 713-23.
- Rappold, I., K. Iwabuchi, T. Date, and J. Chen. 2001. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *In The Journal of Cell Biology*. Vol. 153. 613-20.
- Raynaud, F.I., S. Eccles, P.A. Clarke, A. Hayes, B. Nutley, S. Alix, A. Henley, F. Di-Stefano, Z. Ahmad, S. Guillard, L.M. Bjerke, L. Kelland, M. Valenti, L. Patterson, S. Gowan, A. de Haven Brandon, M. Hayakawa, H. Kaizawa, T. Koizumi, T. Ohishi, S. Patel, N. Saghiri, P. Parker, M. Waterfield, and P. Workman. 2007. Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositol 3-kinases. *In Cancer Research*. Vol. 67. 5840-50.
- Reddy, Y.V., Q. Ding, S.P. Lees-Miller, K. Meek, and D.A. Ramsden. 2004. Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J Biol Chem*. 279:39408-13.
- Reimann, J.D., E. Freed, J.Y. Hsu, E.R. Kramer, J.M. Peters, and P.K. Jackson. 2001. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *In Cell*. Vol. 105. 645-55.
- Riballo, E., M. Kühne, N. Rief, A. Doherty, G.C. Smith, M.J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A.R. Parker, S.P. Jackson, A. Gennery, P.A. Jeggo, and M. Löbrich. 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *In Molecular Cell*. Vol. 16. 715-24.
- Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 146:905-16.
- Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 273:5858-68.
- Roos, W.P., and B. Kaina. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*. 12:440-50.
- Rothkamm, K., and M. Löbrich. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:5057-62.
- Russo, A.A., P.D. Jeffrey, and N.P. Pavletich. 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *In Nat Struct Biol*. Vol. 3. 696-700.
- Ruzankina, Y., C. Pinzon-Guzman, A. Asare, T. Ong, L. Pontano, G. Cotsarelis, V.P. Zediak, M. Velez, A. Bhandoola, and E.J. Brown. 2007. Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell stem cell*. 1:113-26.
- Santamaría, D., C. Barrière, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J.F. Cáceres, P. Dubus, M. Malumbres, and M. Barbacid. 2007. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *In Nature*. Vol. 448. 811-5.
- Sarkaria, J.N., E.C. Busby, R.S. Tibbetts, P. Roos, Y. Taya, L.M. Karnitz, and R.T. Abraham. 1999. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *In Cancer Research*. Vol. 59. 4375-82.
- Sarkaria, J.N., R.S. Tibbetts, E.C. Busby, A.P. Kennedy, D.E. Hill, and R.T. Abraham. 1998. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *In Cancer Research*. Vol. 58. 4375-82.
- Savitsky, K., A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D.A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S.R. Patanjali, A. Simmons, G.A. Clines, A. Sartiel, R.A. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M.F. Lavin, N.G. Jaspers, A.M. Taylor, C.F. Arlett, T. Miki, S.M. Weissman, M. Lovett, F.S. Collins, and Y. Shiloh. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 268:1749-53.
- Schultz, L.B., N.H. Chehab, A. Malikzay, and T.D. Halazonetis. 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 151:1381-90.
- Sedelnikova, O.A., I. Horikawa, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, W.M. Bonner, and J.C. Barrett. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 6:168-70.
- Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, and S.W. Lowe. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88:593-602.
- Shay, J.W., O.M. Pereira-Smith, and W.E. Wright. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental cell research*. 196:33-9.
- Sherr, C.J., and R.A. DePinho. 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*. 102:407-10.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *In Genes & Development*. Vol. 13. 1501-12.
- Shieh, S.Y., J. Ahn, K. Tamai, Y. Taya, and C. Prives. 2000. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *In Genes & Development*. Vol. 14. 289-300.
- Shieh, S.Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *In Cell*. Vol. 91. 325-34.
- Shiloh, Y. 2003a. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*. 3:155-68.
- Shiloh, Y. 2003b. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *In Nat Rev Cancer*. Vol. 3. 155-68.

- Shiloh, Y., and M.B. Kastan. 2001. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res.* 83:209-54.
- Shiotani, B., and L. Zou. 2009. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *In Molecular Cell.* Vol. 33. 547-58.
- Smith, G.C., and S.P. Jackson. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13:916-34.
- Smith, J.R., and O.M. Pereira-Smith. 1996. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science.* 273:63-7.
- Smits, V.A., P.M. Reaper, and S.P. Jackson. 2006. Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *In Curr Biol.* Vol. 16. 150-9.
- Sobhian, B., G. Shao, D.R. Lilli, A.C. Culhane, L.A. Moreau, B. Xia, D.M. Livingston, and R.A. Greenberg. 2007. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science.* 316:1198-202.
- Soutoglou, E., and T. Misteli. 2008. Activation of the Cellular DNA Damage Response in the Absence of DNA Lesions. *Science.* 320:1507.
- Spycher, C., E.S. Miller, K. Townsend, L. Pavic, N.A. Morrice, P. Janscak, G.S. Stewart, and M. Stucki. 2008. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *In The Journal of Cell Biology.* Vol. 181. 227-40.
- Stein, G.H., L.F. Drullinger, A. Souillard, and V. Dulic. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19:2109-2117.
- Stewart, B.W., and D. Catchpoole. 1990. Structural analysis of replicating DNA following exposure to cytotoxic drugs: implications for current models of DNA synthesis in mammalian cells. *Anticancer Drug Des.* 5:141-7.
- Stewart, G.S., R.S. Maser, T. Stankovic, D.A. Bressan, M.I. Kaplan, N.G. Jaspers, A. Raams, P.J. Byrd, J.H. Petrini, and A.M. Taylor. 1999. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell.* 99:577-87.
- Stewart, G.S., S. Panier, K. Townsend, A.K. Al-Hakim, N.K. Kolas, E.S. Miller, S. Nakada, J. Ylanko, S. Olivarius, M. Mendez, C. Oldreive, J. Wildenhain, A. Tagliaferro, L. Pelletier, N. Taubenheim, A. Durandy, P.J. Byrd, T. Stankovic, A.M. Taylor, and D. Durocher. 2009. The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell.* 136:420-34.
- Stewart, G.S., B. Wang, C.R. Bignell, A.M. Taylor, and S.J. Elledge. 2003. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature.* 421:961-6.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich, and P.A. Jeggo. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64:2390-6.
- Stott, F.J., S. Bates, M.C. James, B.B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, K. Ryan, E. Hara, K.H. Vousden, and G. Peters. 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *The EMBO Journal.* 17:5001-14.
- Strebhardt, K., and A. Ullrich. 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *In Nat Rev Cancer.* Vol. 8. 473-80.
- Stucki, M., J.A. Clapperton, D. Mohammad, M.B. Yaffe, S.J. Smerdon, and S.P. Jackson. 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell.* 123:1213-26.
- Su, T.T. 2006. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet.* 40:187-208.
- Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes, and B.D. Price. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13182-7.
- Sun, Y., Y. Xu, K. Roy, and B.D. Price. 2007. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol.* 27:8502-9.
- Syljuasen, R., C. Sorensen, L. Hansen, K. Fugger, C. Lundin, F. Johansson, T. Helleday, M. Sehested, J. Lukas, and J. Bartek. 2005. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *In Molecular and Cellular Biology.* Vol. 25. 3553-3562.
- Taccioli, G.E., A.G. Amatiucci, H.J. Beamish, D. Gell, X.H. Xiang, M.I. Torres Arzayus, A. Priestley, S.P. Jackson, A. Marshak Rothstein, P.A. Jeggo, and V.L. Herrera. 1998. Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity.* 9:355-66.
- Takai, H., K. Naka, Y. Okada, M. Watanabe, N. Harada, S. Saito, C.W. Anderson, E. Appella, M. Nakanishi, H. Suzuki, K. Nagashima, H. Sawa, K. Ikeda, and N. Motoyama. 2002. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *In The EMBO Journal.* Vol. 21. 5195-205.
- Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* 13:1549-1556.
- Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, P.R. Andreassen, R.C. Gregory, M. Grompe, and A.D. D'Andrea. 2002. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *In Blood.* Vol. 100. 2414-20.
- Taverna, S.D., H. Li, A.J. Ruthenburg, C.D. Allis, and D.J. Patel. 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol.* 14:1025-40.
- Taylor, W.R., and G.R. Stark. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *In Oncogene.* Vol. 20. 1803-15.
- Te Poele, R.H., A.L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings, and S.P. Joel. 2002. DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *In Cancer Research.* Vol. 62. 1876.
- Tibbetts, R.S., K.M. Brumbaugh, J.M. Williams, J.N. Sarkaria, W.A. Cliby, S.Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, and R.T. Abraham. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *In Genes & Development.* Vol. 13. 152-7.
- Tomimatsu, N., B. Mukherjee, and S. Burma. 2009. Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Rep.*

- Ubersax, J.A., E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethrow, K. Shah, K.M. Shokat, and D.O. Morgan. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *In* *Nature*. Vol. 425. 859-64.
- Uematsu, N., E. Weterings, K. Yano, K. Morotomi-Yano, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, P.O. Mari, D.C. van Gent, B.P. Chen, and D.J. Chen. 2007. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 177:219-29.
- Uziel, T., Y. Lerenthal, L. Moyal, Y. Andegeko, L. Mittelman, and Y. Shiloh. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*. 22:5612-21.
- van Attikum, H., and S.M. Gasser. 2009. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol*. 19:207-17.
- van Vugt, M.A., and R.H. Medema. 2005. Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *In* *Oncogene*. Vol. 24. 2844-59.
- Vassilev, L.T. 2007. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 13:23-31.
- Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *In* *Nature*. Vol. 408. 307-10.
- Wakeling, A.E., E. Newbould, and S.W. Peters. 1989. Effects of antioestrogens on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *In* *J Mol Endocrinol*. Vol. 2. 225-34.
- Walter, J., and J. Newport. 2000. Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell*. 5:617-27.
- Wang, B., and S.J. Elledge. 2007. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brc1/Brc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:20759-63.
- Wang, B., S. Matsuoka, B.A. Ballif, D. Zhang, A. Smogorzewska, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*. 316:1194-8.
- Wang, Q., S. Fan, A. Eastman, P.J. Worland, E.A. Sausville, and P.M. O'Connor. 1996. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *In* *J Natl Cancer Inst*. Vol. 88. 956-65.
- Wang, X., P.R. Andreassen, and A.D. D'Andrea. 2004. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol*. 24:5850-62.
- Ward, I.M., and J. Chen. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*. 276:47759-62.
- Watanabe, N., H. Arai, J. Iwasaki, M. Shiina, K. Ogata, T. Hunter, and H. Osada. 2005. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *In* *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 102. 11663-8.
- Welsh, P.L., K.N. Owens, and M.C. King. 2000. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*. 16:69-74.
- West, S.C. 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:435-45.
- Wilsker, D., E. Petermann, T. Helleday, and F. Bunz. 2008. Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *In* *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 105. 20752-7.
- Wood, J.L., and J. Chen. 2008. DNA-damage checkpoints: location, location, location. *In* *Trends Cell Biol*. Vol. 18. 451-5.
- Xiao, Z., Z. Chen, A.H. Gunasekera, T.J. Sowin, S.H. Rosenberg, S. Fesik, and H. Zhang. 2003. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *In* *J Biol Chem*. Vol. 278. 21767-73.
- Xu, B., S.T. Kim, D.S. Lim, and M.B. Kastan. 2002. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. 22:1049-59.
- Xu, X., S. Vaithiyalingam, G.G. Glick, D.A. Mordes, W.J. Chazin, and D. Cortez. 2008. The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling. *Mol Cell Biol*. 28:7345-53.
- Xu, Y., and D. Baltimore. 1996. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev*. 10:2401-10.
- Xue, W., L. Zender, C. Miething, R.A. Dickins, E. Hernandez, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S.W. Lowe. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 445:656-60.
- Yamauchi, M., Y. Oka, M. Yamamoto, K. Niimura, M. Uchida, S. Kodama, M. Watanabe, I. Sekine, S. Yamashita, and K. Suzuki. 2008. Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *In* *DNA Repair*. Vol. 7. 405-17.
- Yan, S., and W.M. Michael. 2009. TopBP1 and DNA polymerase-alpha directly recruit the 9-1-1 complex to stalled DNA replication forks. *The Journal of Cell Biology*. 184:793-804.
- Yata, K., and F. Esashi. 2009. Dual role of CDKs in DNA repair: To be, or not to be. *In* *DNA Repair*. Vol. 8. 6-18.
- Yazdi, P. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & Development*. 16:571-582.
- Ye, S.K., K. Maki, T. Kitamura, S. Sunaga, K. Akashi, J. Domen, I.L. Weissman, T. Honjo, and K. Ikuta. 1999. Induction of germline transcription in the TCRgamma locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *In* *Immunity*. Vol. 11. 213-23.
- Yoo, H.Y., A. Kumagai, A. Shevchenko, A. Shevchenko, and W.G. Dunphy. 2007. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. *In* *J Biol Chem*. Vol. 282. 17501-6.
- You, Z., C. Chahwan, J. Bailis, T. Hunter, and P. Russell. 2005. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol*. 25:5363-79.
- Yu, Z.K., J.L. Gervais, and H. Zhang. 1998. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *In* *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 95. 11324-9.
- Yuan, S.S., S.Y. Lee, G. Chen, M. Song, G.E. Tomlinson, and E.Y. Lee. 1999. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res*. 59:3547-51.
- Zhang, Y.W., D.M. Otterness, G.G. Chiang, W. Xie, Y.C. Liu, F. Mercurio, and R.T. Abraham. 2005. Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *In* *Molecular Cell*. Vol. 19. 607-18.



- Zhao, H., and H. Piwnicka-Worms. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol.* 21:4129-39.
- Zhu, J., D. Woods, M. McMahon, and J.M. Bishop. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic raf. *Genes Dev.* 12:2997-3007.
- Zhu, Z., W.H. Chung, E.Y. Shim, S.E. Lee, and G. Ira. 2008. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *In Cell.* Vol. 134. 981-94.
- Ziv, Y., D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek, and Y. Shiloh. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *In Nature Cell Biology.* Vol. 8. 870-6.
- Zou, L. 2002. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes & Development.* 16:198-208.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 300:1542-8.
- Zou, L., D. Liu, and S.J. Elledge. 2003. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13827-32.
- Zou, L., and B. Stillman. 1998. Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *In Science.* Vol. 280. 593-6.

